

Aus dem Pathologischen Institut  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

*JAK2* V617F Mutationsanalysen an  
mikrodissektierten Zellen bei myeloproliferativen  
Neoplasien

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von Leonie Fahrenkrog-Petersen

aus Berlin

München 2018



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter:	Univ. Prof. Dr. med. Karl Sotlar
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Martin Dreyling
	Prof. Dr. med. Michael Albert
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Hans-Peter Horny
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	25.01.2018



*Meinen Eltern*  
*Sylvia Fahrenkrog-Petersen*  
*und*  
*Karl-Heinz Angsten*  
*gewidmet*

Abkürzungsverzeichnis

<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol	<b>dATP<math>\alpha</math>S</b>	Desoxyadenosin- $\alpha$ -Thiotriphosphat
<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase	<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Double-distilled water
<b>AML</b>	akute myeloische Leukämie	<b>DGHO</b>	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase	<b>DMSZ</b>	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH
<b>APS</b>	Adenosin 5'Phosphosulfat	<b>DNMT3A</b>	DNA (Cytosin-5) Methyltransferase 3A
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure	<b>dNTPs</b>	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ASXL1</b>	additional sex combs like 1	<b>EEC</b>	endogene erythroide Kolonie
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>EPO</b>	Erythropoetin
<b>BCR-ABL</b>	Breakpoint cluster region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1	<b>EPX</b>	Eosinophilen Peroxidase
<b>BFU-E</b>	Burst forming unit erythroid	<b>ET</b>	Essentielle Thrombozythämie
<b>C-Atom</b>	Kohlenstoffatom	<b>EZH2</b>	Enhancer of zeste homolog 2
<b>CALR</b>	Calreticulin	<b>FERM-Domäne</b>	4.1 Ezrin, Radixin und Moesin
<b>CCD-</b>	Charge coupled device-	<b>FRET</b>	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
<b>Kamera</b>	Camera	<b>G</b>	Guanin
<b>CD</b>	Cluster of differenziation	<b>G-CSF</b>	Granulocyte-colony stimulating factor
<b>CEL</b>	Chronische Eosinophilenleukämie	<b>GAS</b>	$\gamma$ -Interferon acitivation site
<b>CFU</b>	colony forming unit	<b>GEMM</b>	granulocyte, erythroid, macrophage, megacaryozyte
<b>CFU-Baso</b>	CFU-basophil granulocytes	<b>Gly C</b>	Glykophorin C
<b>CFU-DC</b>	CFU-dendritic cells	<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macropahge stimulating factor
<b>CFU-E</b>	CFU-erythroid	<b>GMP</b>	myelomonozytäre Progenitorzelle
<b>CFU-Eos</b>	CFU-eosinophil granulocytes	<b>HSC</b>	hämatopoetische Stammzelle
<b>CFU-M</b>	CFU-macrophage	<b>IDH1/2</b>	isocitrate dehydrogenase 1 & 2
<b>CFU-Meg</b>	CFU-megacaryocyte	<b>IL3</b>	Interleukin 3
<b>CLP</b>	common lymphoid progenitor		
<b>CML</b>	Chronische myeloische Leukämie		
<b>CMP</b>	common myeloid Progenitor		
<b>CNL</b>	Chronische Neutrophilenleukämie		
<b>DANN</b>	Desoxyribonukleinsäure		
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat		

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>IWG-MRT</b>	International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment	<b>MPP</b>	multipotente Progenitorzelle
<b>JAK</b>	Janus-Kinase	<b>NLS</b>	nukleäres Lokalisationssignal
<b>JAK-STAT</b>	Janus-Kinase Signal transducer and activator of transcription	<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>JH</b>	JAK homology	<b>PMF</b>	Primäre Myelofibrose
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid	<b>PTK2</b>	Protein-Tyrosin-Kinase 2
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase	<b>PTPasen</b>	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
<b>LKN- Protein</b>	Leukotactin-Protein	<b>PTT</b>	partielle Thromboplastinzeit
<b>LNA</b>	Locked Nukleid Acid	<b>PV</b>	Polyzythämia vera
<b>LOH</b>	Loss of heterozygosity	<b>PVr-1- mRNA</b>	
<b>MCT</b>	Mastzelltryptase	<b>SCF</b>	Stemcell factor
<b>MDS</b>	Myelodysplastisches Syndrom	<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>MEP</b>	Megakaryoerythrozytäre Progenitorzelle	<b>SH-2-linke</b>	Scr-homology-2-like
<b>MF</b>	Myelofibrose	<b>SOCS</b>	Suppressor of Cytokin Signaling
<b>MgCl</b>	Magnesiumchlorid	<b>ssDNA</b>	Single-stranded DNA
<b>MPL</b>	myeloproliferative leukemia virus onkogene	<b>T</b>	Thymin
<b>MPN</b>	Myeloproliferative Neoplasien	<b>TET2</b>	oncogene family member
<b>MPN-u</b>	unklassifizierbare Myeloproliferative Neoplasien	<b>TGFBR2</b>	transforming growth factor $\beta$ Typ II Rezeptor
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase	<b>Tm</b>	Schmelzpunkttemperatur
		<b>TPO</b>	Thrombopoetin
		<b>TYK2</b>	Tyrosinkinase 2
		<b>WHO</b>	World health organisation
		<b>WT</b>	Wild Typ
		<b>yGT</b>	Gamma-Glutamyl- Transferase
		$\lambda$	Wellenlänge

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	DIE HÄMATOPOESE	4
2.2	DIE JAK-STAT-SIGNALKASKADE	6
2.3	DIE PATHOGENESE DER MPN	8
2.3.1	DIE <i>JAK2</i> V617F MUTATION	9
2.3.2	WEITERE SOMATISCHE MUTATIONEN	11
2.3.3	MOLEKULARE UNTERSCHIEDE BEI DER PV, ET UND PMF	15
2.4	EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK DER MPN	16
2.4.1	POLYZYTHÄMIA VERA	16
2.4.1.1	Diagnostische Kriterien der PV	17
2.4.1.2	Histologie der PV	18
2.4.2	ESSENTIELLE THROMBOZYTHÄMIE	19
2.4.2.1	Diagnostische Kriterien einer ET	19
2.4.2.2	Histologie der ET	20
2.4.3	PRIMÄRE MYELOFIBROSE	20
2.4.3.1	Diagnostische Kriterien einer PMF	21
2.4.3.2	Histologie der PMF	23
2.5	THERAPIE DER MPN	24
2.5.1	MAßNAHMEN ZUR SYMPTOMKONTROLLE	24
2.5.1.1	Allgemeine Maßnahmen	24
2.5.1.2	Medikamentöse Therapie	25
2.5.2	ZYTOREDUKTIVE THERAPIEFORMEN	25
2.6	ZIELE DER ARBEIT	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
3.1	MATERIAL	28
3.1.1	PATIENTENMATERIAL	28
3.1.2	KONTROLL-DNA	28
3.2	METHODEN	29
3.2.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	29
3.2.2	<i>JAK2</i> -MUTATIONSANALYSEN AN GESAMT-DNA	33
3.2.2.1	DNA-Extraktion	33
3.2.2.2	DNA-Amplifikation	33
3.2.2.3	Schmelzpunktanalyse mit Hybridisierungssonden	35
3.2.2.4	Auswertung der Schmelzkurven	37
3.2.2.5	Pyrosequenzierung	38
3.2.3	<i>JAK2</i> V617F-MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN ZELLEN	42
3.2.3.1	Lasermikrodissektion von Einzelzellen	42
3.2.3.2	Aufbereitung der mikrodissektierten Zellen	45
3.2.3.3	Amplifikation der DNA aus mikrodissektierten Zellen	46
3.2.3.4	Auswertung der Ergebnisse	46
3.2.3.5	Verdünnungsreihe zur Ermittlung der analytischen Sensitivität	46
3.2.4	MUTATIONSANALYSEN BEI <i>JAK2</i> V617F-NEGATIVEN PATIENTEN	47
3.2.4.1	Nachweis <i>MPL</i> W515L Mutation	47
3.2.4.2	Nachweis von <i>CALR</i> -Mutationen	49

<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>51</b>
4.1	PATIENTENKOLLEKTIV	51
4.2	ERMITTLUNG DER ANALYTISCHEN SENSITIVITÄT	55
4.3	DER MUTATIONSSTATUS DER UNTERSUCHTEN MPN PATIENTEN	56
4.4	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN ZELLEN	57
4.4.1	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN ERYTHROBLASTEN	57
4.4.2	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN MEGAKARYOZYTEN	58
4.4.3	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	60
4.4.4	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN	61
4.4.5	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN BASOPHILEN GRANULOZYTEN	62
4.4.6	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN MASTZELLEN	64
4.4.7	MUTATIONSANALYSEN AN MIKRODISSEKTIERTEN T-LYMPHOZYTEN	66
4.4.8	DER <i>JAK2</i> V617F MUTATIONSSTATUS BEI PATIENTEN MIT PV	69
4.4.9	DER <i>JAK2</i> V617F MUTATIONSSTATUS BEI PATIENTEN MIT PMF	70
4.4.10	DER <i>JAK2</i> V617F MUTATIONSSTATUS BEI PATIENTEN MIT ET	71
4.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	72
5	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>73</b>
5.1	DISKUSSION DER METHODEN	73
5.1.1	DISKUSSION DER MORPHOLOGISCHEN BEFUNDE	73
5.1.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	74
5.1.3	METHODENVERGLEICH	75
5.2	DIE BEDEUTUNG DES <i>JAK2</i> MUTATIONSSTATUS BEI DEN MPN	76
5.2.1	DIE <i>JAK2</i> V617F MUTATION BEI DEN PATIENTEN MIT PV	77
5.2.2	DIE <i>JAK2</i> V617F MUTATION BEI DEN PATIENTEN MIT PMF	78
5.2.3	DIE <i>JAK2</i> V617F MUTATION BEI DEN PATIENTEN MIT ET	78
5.2.4	KORRELATION DES MUTATIONSSTATUS MIT DEN LABORCHEMISCHEN PARAMETERN	79
6	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>81</b>
7	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>83</b>
8	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>98</b>
9	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>99</b>
10	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b>100</b>
11	<b><u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u></b>	<b>101</b>

## 2 Einleitung

---

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind eine heterogene Gruppe hämatologischer Neoplasien, die durch eine autonom gesteigerte Proliferation einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen charakterisiert sind (Kralovics, Passamonti et al. 2005). Im Gegensatz zu anderen hämatologischen Neoplasien zeichnen sich die transformierten Zellen durch eine normale Differenzierungskapazität aus.

In der aktuellen WHO-Klassifikation werden folgende Erkrankungen in der Gruppe der MPN zusammengefasst (Tefferi and Vardiman 2008):

1. Chronische myeloische Leukämie (CML)
2. Chronische Neutrophilenleukämie (CNL)
3. **Polyzythämia vera (PV)**
4. **Primäre Myelofibrose (PMF)**
5. **Essentielle Thrombozythämie (ET)**
6. Chronische Eosinophilenleukämie (CEL)
7. Mastozytose
8. Unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MNP-u)

Erkrankungen die anhand der WHO-Kriterien keiner definierten Neoplasie (1.-7.) zuzuordnen sind, werden als unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MPN-u) bezeichnet. Neben der Philadelphia Chromosom t(9;22)(q34;q11) positiven CML sind die PV, die ET und die PMF die häufigsten Vertreter der MPN.

Pathogenetisch sind MPNs in der Regel auf die Transformation einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSC) zurückzuführen. Bei der PV, der ET und der PMF ist diese Transformation in einem Großteil der Fälle durch eine Mutation im Janus-Kinase-2-Gen (*JAK2*) bedingt. Im Jahr 2005 wurde eine aktivierende Mutation im Codon 617 des *JAK2* Gen identifiziert (Baxter, Scott et al. 2005, James, Ugo et al. 2005, Kralovics, Passamonti et al. 2005, Levine, Wadleigh et al. 2005, Zhao, Xing et al. 2005). Die *JAK2* V617F Mutation induziert eine konstitutive Aktivierung der JAK-STAT Signalkaskade und führt zu einer gesteigerten Proliferation und verminderten Apoptose der Zellklone (Hussein, Busche et al. 2012). Die Identifikation der *JAK2* V617F Mutation hat entscheidend zum Verständnis der Pathogenese der MPN beigetragen und die Voraussetzung für neue diagnostische und therapeutische Herangehensweisen geschaffen (Baxter, Scott et al. 2005).

## 2.1 Die Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet die Bildung und Differenzierung von hämatopoetischen Effektorzellen aus einer gemeinsamen pluripotenten HSC im adulten Organismus. Die HSC befinden sich in einem inaktiven Grundzustand in spezialisierten Knochenmarksnischen, die sich unter anderem aus Stromazellen, Fibroblasten, Mesenchymzellen, Adipozyten, Osteoblasten/-klasten, endothelialen Stammzellen und einer komplexen extrazellulären Matrix zusammensetzen. Die HSC werden unterteilt in *long-term* HSC, zur Selbstregeneration (*self-renewal*) und *short-term* HSC, aus denen die Differenzierung zu reifen hämatopoetischen Zellen erfolgt (Spangrude, Heimfeld et al. 1988, Morrison, Uchida et al. 1995). Immunphänotypisch weisen die HSC eine Positivität für das Oberflächenantigen CD34 auf. Im Laufe der Differenzierung zu determinierten hämatopoetischen Zellen verlieren die HSC ihre Multipotenz und das Oberflächenantigenmuster der Zellen verändert sich kontinuierlich.

Die Zellproliferation und Differenzierung der HSC wird durch ein Zusammenspiel aus zellulären und humoralen Mechanismen wie z.B. durch Zytokine kontrolliert (Heissig, Ohki et al. 2005, Suda, Arai et al. 2005). Zytokine sind kleine hormonähnliche Peptide, die durch ihre Bindung an spezifische Zytokin-Rezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. Ein wichtiges Zytokin im Rahmen der Hämatopoese ist der Stammzellfaktor (*stemcell factor* = SCF). Er wird konstitutiv von den Stromazellen, aber auch von Zellen wie Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert und stimuliert synergistisch mit weiteren Wachstumsfaktoren die Differenzierung der *short-term* HSC zu multipotenten Progenitorzellen (MPP). Aus den MPP leiten sich myeloische (CMP = *common myeloid Progenitor*, CFU-GEMM = *colony forming unit – granulocyte, erythroid, macrophage, megacaryocyte*) und lymphatische (CLP = *common lymphoid progenitor*) Stammzellen ab (Passegue, Jamieson et al. 2003).

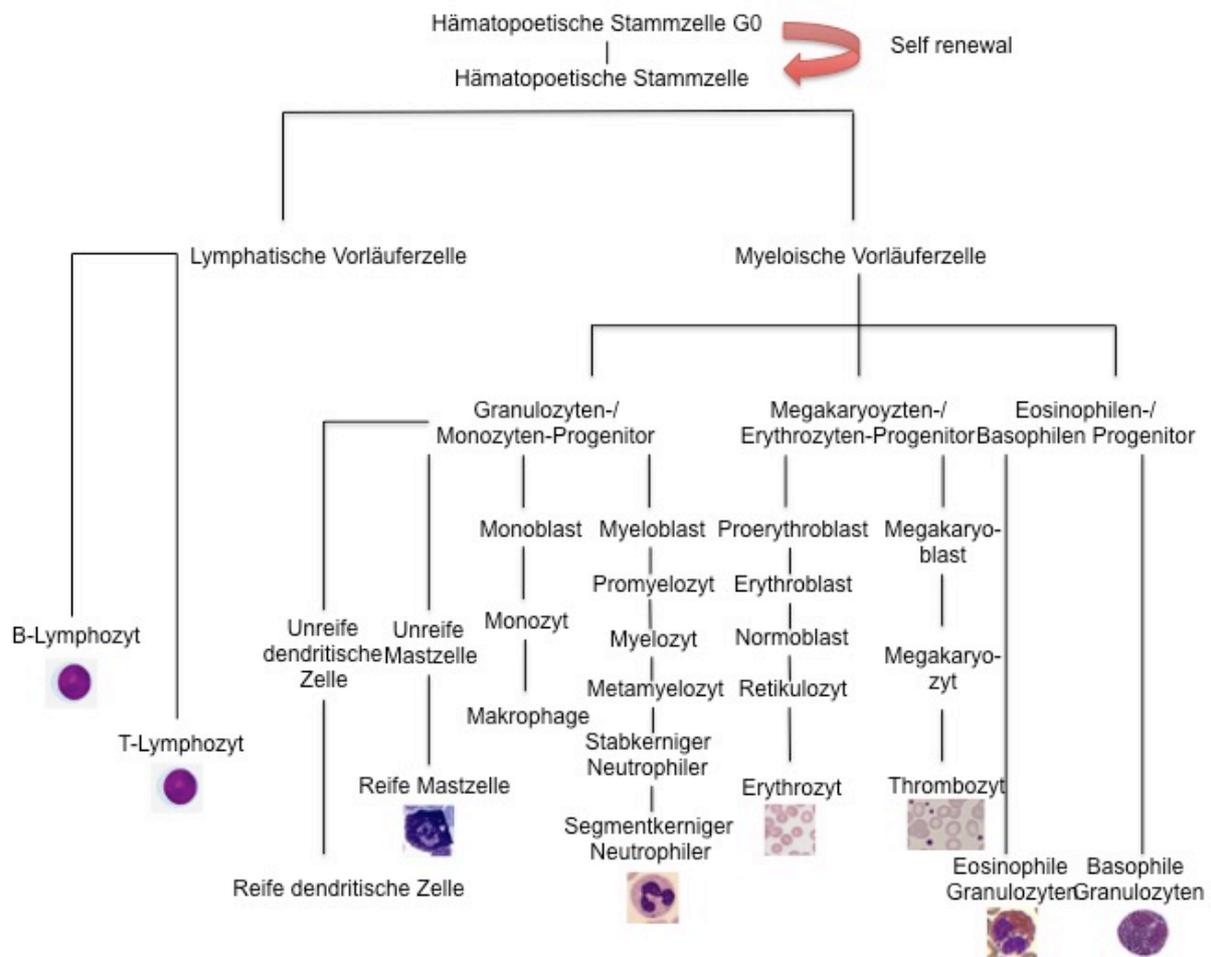
Die CMP bilden in vitro hämatopoetische Kolonien, die als CFU (*colony forming unit*) bezeichnet werden. Je nach Differenzierungsrichtung können folgende CFUs unterschieden werden: CFU-GEMM, BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*), CFU-E (CFU-*erythroid*), CFU-Meg (CFU-*megakaryocyte*), CFU-GM (CFU- *granulocyte / macrophage*), CFU-G (CFU-*granulocyte*), CFU-M (CFU-*macrophage*), CFU-Eos (CFU-*eosinophil granulocytes*), CFU-Baso (CFU-*basophil granulocyte*), CFU-DC (CFU-*dendritic cells*), CFU-Mastcells.

Von den myeloischen Stammzellen spalten sich myelo-monozytäre (GMP) und megakaryo-erythrozytäre Progenitorzellen (MEP) ab. Aus den MEP gehen über Zwischenstufen Erythrozyten, Megakaryozyten und Thrombozyten hervor. Die Thrombopoese und die Erythropoese differenzieren sich ab dem MEP-Stadium getrennt voneinander. Zellen der Erythropoese werden durch das in der Niere gebildete Erythropoetin (EPO) stimuliert (Goldwasser, Beru et al. 1990) und können durch die linienspezifischen Oberflächenmarker Glykophorin A (CD235A+) und CD71+ (Transferrinrezeptor) identifiziert werden. Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Sauerstoff- und

Kohlenstoffdioxidtransport im Blut. Von den Megakaryozyten trennen sich Thrombozyten als kernlose Zytoplasmaabschnürungen ab und übernehmen eine zentrale Rolle im Rahmen der Hämostase. Die Megakaryozyten tragen die Oberflächenantigene CD61 und CD41.

Die GMP exprimieren membranös CD15 und CD14 und können sich zu neutrophilen / eosinophilen / basophilen Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen differenzieren und sind wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr.

Aus der CLP differenzieren sich unter Einfluss von Interleukin 2, Thymopoetin und weiteren Zytokinen T- / B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und lymphoide dendritische Zellen, denen ebenfalls wichtige Aufgaben im Rahmen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems zukommen.



**Abbildung 1:** Abbildung der Hämatopoese im Knochenmark (geändert nach Orkin & Zon, 2008)

## 2.2 Die JAK-STAT-Signalkaskade

Der *Janus-Kinase Signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) Signalweg ist ein *second-messenger-unabhängiger* Signalweg, der durch die Bindung extrazellulärer Peptide (Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF, GM-CSF etc.) an einen transmembranen Zytokinrezeptor aktiviert wird (Aaronson and Horvath 2002).

Zytokinrezeptoren verfügen über keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Diese wird ihnen von den Rezeptor-assoziierten zytoplasmatischen Proteinen der JAK-Familie bereitgestellt. Aufgrund der Schlüsselrolle der Januskinasen im Rahmen der Signaltransduktion multipler hämatopoetischer Wachstumsfaktoren stellten sie einen attraktiven Kandidaten bei der Suche nach einer MPN-auslösenden Mutation dar (Komura, Chagraoui et al. 2003, Ugo, Marzac et al. 2004).

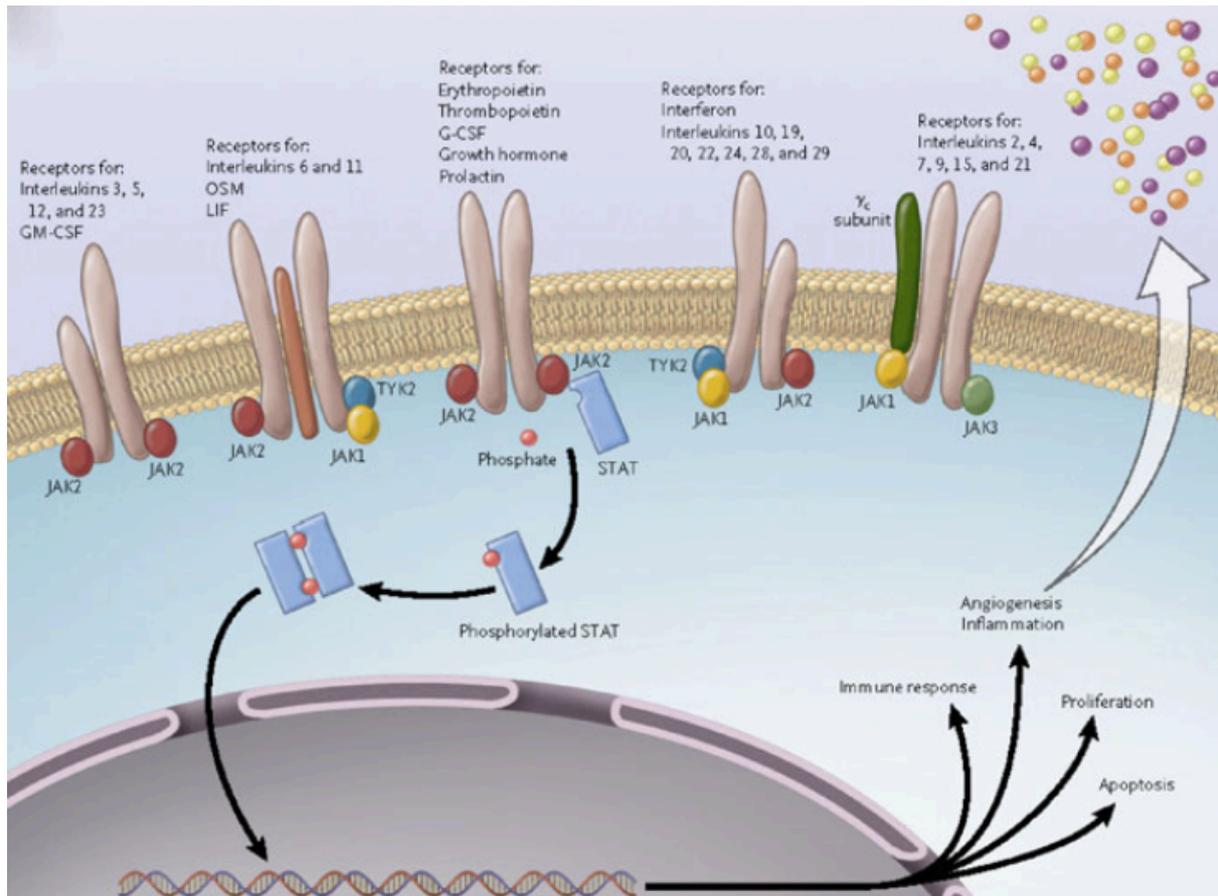
Bei Säugetieren sind vier verschiedene konservierte Januskinase (JAK)-Proteine bekannt: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 (Tyrosinkinase 2) (Feng, Witthuhn et al. 1997). Das *JAK2*-Gen ist auf Chromosom 9 lokalisiert. Die JAK-Proteine sind intrazellulär an die Zytokin-Rezeptoren gebunden und aus jeweils sieben homologen Domänen aufgebaut. Die Domänen werden in eine JH1 Kinase-Domäne, eine JH2 Pseudokinase-Domäne, eine Src-homology-2-like Domäne (SH2-like Domäne) und eine FERM-Domäne (4.1 Ezrin, Radixin und Moesin) unterteilt. Die JH1 Domäne ist am Carboxyterminus des Proteins lokalisiert und ist Träger der enzymatischen Kinaseaktivität. Bei der JH2-Domäne handelt es sich um eine Pseudokinaseeinheit ohne intrinsische katalytische Aktivität, bei der eine inhibierende Wirkung auf die JH1 Domäne bekannt ist. Eine Deletion der Pseudokinaseeinheit resultiert in einer konstitutiven Aktivierung der JAK-STAT-Signalkaskade. Die JH3 und JH4 Domänen werden zur Src-2-like Domäne (SH2-like Domäne) zusammengefasst und vermitteln die Bindung des Proteins an Phosphotyrosinreste. Der Aminoterminus der JAK Proteine wird von der JH7 Domäne gebildet und ist Träger der FERM-Domäne. Die FERM-Domäne dient der Interaktion der JAK-Proteine mit den spezifischen Zytokinrezeptoren und / oder anderen Kinasen (Levine 2012).

Nach der Bindung eines Peptids an den transmembranen Rezeptor werden die JAK-Proteine aktiviert und katalysieren sowohl ihre eigene Phosphorylierung als auch die Phosphorylierung von Rezeptorzugehörigen Tyrosinresten (Leonard 2001). Die STATs (*Signal transducer and activator of transcription*) erkennen die Phosphotyrosinreste und binden über ihre SH2-Domäne (*Src-homology 2*) an den Rezeptor. STATs sind inaktive Transkriptionsfaktoren, die im Zytoplasma der unstimulierten Zielzellen lokalisiert sind. Bei Säugetieren sind sieben verschiedene konservierte STAT-Proteine bekannt: *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5A/B* und *STAT6* (Levy and Darnell 2002). Nach Bindung der STAT-Monomere an den Rezeptor werden sie von JAK-Proteinen an ihrem carboxyterminalen Tyrosinrest phosphoryliert, wodurch auf ihrer Oberfläche SH2-Domänen entstehen (Nelms, O'Neill et al. 1999). Im nächsten Schritt dissoziieren die STAT-Monomere vom Rezeptor und lagern sich über die neuentstandenen SH2-Domänen zu Hetero- oder Homodimeren zusammen

(Muller, Kuttenkeuler et al. 2005). Aktivierte STAT-Dimere tragen ein *nukleäres Lokalisationssignal* (NLS), welches ihre Translokation in den Nukleus ermöglicht (Aaronson & Horvath, 2002). Im Nukleus binden die STAT-Dimere an ein invertiertes repetitives DNA-Sequenzelement (Palindrom-Sequenz), bestehend aus 8 bis 10 Basenpaaren mit der Konsensus-Sequenz: 5'- TT (N<sub>4-6</sub>) AA-3'. Das DNA-Element wird als GAS-Element ( $\gamma$ -Interferon activation site) bezeichnet und befindet sich auf der Promoterregion des Ziel-Gens (Horvath, Wen et al. 1995). Das GAS-Element ist nach der Bindung des *STAT1* Homodimer an die  $\gamma$ -Interferon-Aktivierungssequenz benannt (Decker, Lew et al. 1991). Die verschiedenen STAT-Typen binden bevorzugt an eine unterschiedliche Anzahl an Nukleotiden zwischen der Palindrom-Sequenz z.B. sind es bei *STAT6* vier Nukleotide und bei *STAT1* drei Nukleotide die, die zwei Hälften des Palindroms trennen (Schindler, Wu et al. 1995).

Die STATs können nach Bindung an die DNA die Gen-Transkriptionsrate über die Aktivierung von Promotoren direkt stimulieren. Zusätzlich sind STAT-abhängige Transkriptionsmechanismen in Form von Komplex-Bildung der STATs mit nicht-STAT-Transkriptionsfaktoren, simultane Bindungen von STATs und nicht-STAT-Transkriptionsfaktoren an die DNA und die Beeinflussung von Promotor-gebundenen Proteinen bekannt (Shuai 2000).

Die Inaktivierung der JAK-STAT Signalkaskade erfolgt auf verschiedenen Ebenen des Signalwegs. Ein Mechanismus ist die klassische Inaktivierung durch Internalisierung des Rezeptors mittels Endozytose und seiner anschließenden Degradierung. Des Weiteren spielen die *Suppressor of Cytokine Signaling* Proteine (SOCS) eine wichtige Rolle. Die Expression der SOCS-Proteine wird durch dieselben Liganden stimuliert, die zu einer Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs führen. SOCS-Proteine können unter anderem JAK-Proteine direkt inaktivieren, den Zugang der STATs zu ihrer Bindungsstelle blockieren und wichtige Signalproteine und deren Ziel-Proteasome durch Ubiquitinierung beeinflussen (Krebs and Hilton 2001). Ein weiterer Mechanismus ist die Inaktivierung durch spezifische Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen). Durch Dephosphorylierung der STAT-Dimere auf Ebene des Membran-assozierten Rezeptor-Kinase-Komplexes (David, Chen et al. 1995, Irie-Sasaki, Sasaki et al. 2001, Myers, Andersen et al. 2001) oder direkt am Nukleus können die PTPasen die Signalkaskade unterbrechen. Die dephosphorylierten STAT-Monomere werden im Anschluss ins Zytoplasma zurückverlagert (Haspel, Salditt-Georgieff et al. 1996, Shuai 2000).



**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der JAK-STAT Signalkaskade (Levine 2012).

### 2.3 Die Pathogenese der MPN

Bis zur Entdeckung der *JAK2* V617F Mutation im Jahre 2005 (Baxter, Scott et al. 2005, James, Ugo et al. 2005, Kralovics, Passamonti et al. 2005, Levine, Wadleigh et al. 2005, Zhao, Xing et al. 2005) blieb die Pathogenese der *BCR-ABL* negativen MPN weitestgehend unklar. Studien, die eine Hypersensitivität erythroider und myeloider Progenitorzellen gegenüber Wachstumsfaktoren zeigten (Dai, Krantz et al. 1992, Kobayashi, Teramura et al. 1993, Li, Hetet et al. 1994, Axelrad, Eskinazi et al. 2000) und die Wachstumsfaktor-unabhängige Bildung von *Colony forming units* (CFU) in vitro, deuteten aber bereits auf eine Mutation innerhalb der durch Wachstumsfaktoren aktivierten Signalkaskaden hin (Hinshelwood, Bench et al. 1997). Die Theorie wurde 2004 durch eine induzierte Überexpression von aktivierten Kinase-Rezeptoren in Mausmodellen belegt (Araki, Mohi et al. 2004, Chan, Kutok et al. 2004, Le, Kong et al. 2004).

### 2.3.1 Die *JAK2* V617F Mutation

Die *JAK2* V617F Mutation im Exon 14 ist die häufigste somatische Mutation bei den *BCR-ABL* negativen MPN. Die *JAK2* V617F Mutation ist bei ca. 95% der Patienten mit PV und bei jeweils 50-60% der Patienten mit ET und PMF nachweisbar (Campbell and Green 2006). Es handelt sich um eine dominante *Gain-of-function* Mutation (Kralovics, Passamonti et al. 2005), bei der die Base Guanin durch Thymin (G → T) im Codon 617 an der Nukleotidposition 2343 ersetzt wird und einen Austausch der Aminosäuren Valin zu Phenylalanin im *JAK2*-Protein bedingt. Die Punktmutation befindet sich auf einem Genabschnitt, der für die Pseudokinase-Domäne (JH2-Domäne) des *JAK2*-Proteins kodiert. Durch den Aminosäureaustausch wird die inhibitorische Funktion der JH2-Domäne destabilisiert und es resultiert eine gesteigerte Aktivität der JH1-Kinase-Domäne (Baxter, Scott et al. 2005). Aus Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass eine Mutation im Bereich der Pseudokinasedomäne zu einer malignen Transformation hämatopoetischer Stammzellen führt (Luo, Rose et al. 1997).

Im Mausmodell induziert die *JAK2* V617F Mutation einen PV-ähnlichen Phänotyp (James, Ugo et al. 2005, Lacout, Pisani et al. 2006, Wernig, Mercher et al. 2006) mit einer möglichen Progression in eine sekundäre Myelofibrose (Lacout et al., 2006; Wernig et al., 2006).

Der Nachweis der *JAK2* V617F Mutation sowohl in CFU-GM als auch in BFU-E deutet daraufhin, dass es sich bei dem transformierten Zellklon um eine multipotente HSC handelt, welche sich sowohl zu myeloiden als auch zu erythroiden Zellen differenzieren kann (Baxter, Scott et al. 2005). Es sind jedoch bei einem kleinen Anteil von PV- und PMF- Patienten B-Lymphozyten nachweisbar, die von dem transformierten Subklon abstammen und Träger der *JAK2* V617F Mutation sind (Ishii, Bruno et al. 2006, Delhommeau, Dupont et al. 2007). Die Verteilung der *JAK2*-Mutation innerhalb der neoplastischen Zellklone ist nicht gleichmäßig. Diverse Studien wiesen eine Koexistenz *JAK2*-mutierter und wild-Typ Zellen nach (Ishii, Bruno et al. 2006, Jamieson, Gotlib et al. 2006, Scott, Scott et al. 2006, Delhommeau, Dupont et al. 2007, Pardanani, Lasho et al. 2007, Beer, Jones et al. 2009).

Hussein, Bock et al. (2009) zeigten anhand ihrer Untersuchungen, dass die *JAK2* V617F Mutation wahrscheinlich sekundär im Rahmen einer bereits monoklonalen Hämatopoese erworben wird und nicht den ersten molekularen Defekt in der klonalen Evolution darstellt (Hussein, Busche et al. 2012). Sowohl Zellen die sich aus der betroffenen mutierten myeloischen Stammzelle differenzieren als auch mutierte B-Lymphozyten sind letztendlich monoklonal. T-Lymphozyten sind dagegen polyklonal (el-Kassar, Hetet et al. 1997, Liu, Jelinek et al. 2003).

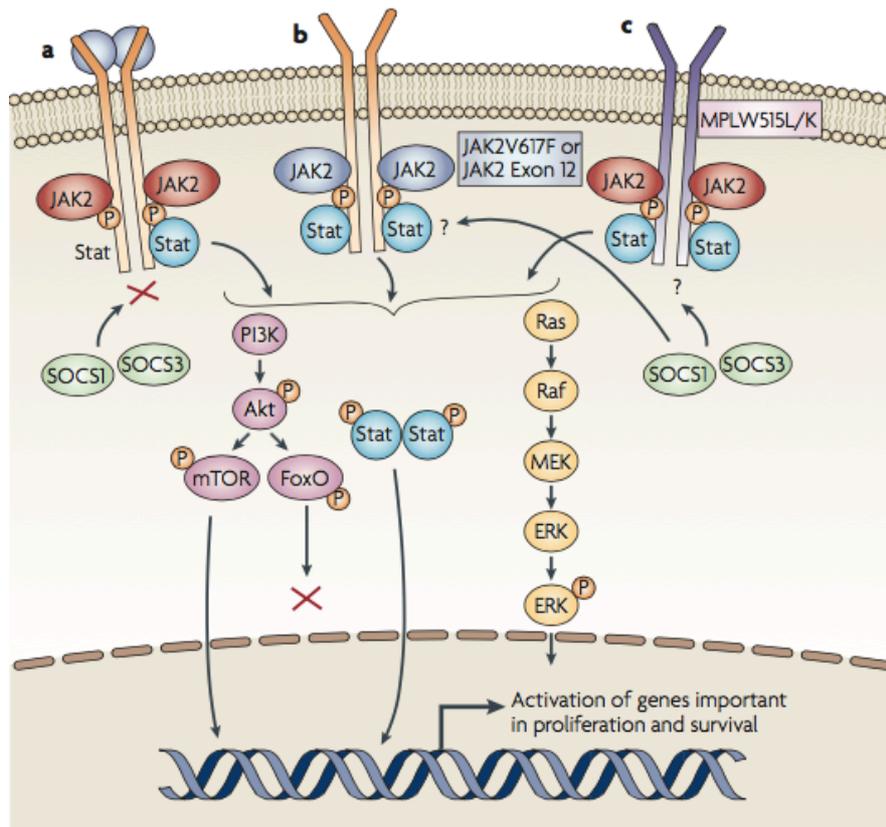
Ferner ist aus diversen Studien bekannt, dass modifizierte *JAK2* V617F-STAT5 Signalkaskaden hypersensitiv gegenüber EPO (James, Ugo et al. 2005, Levine, Loriaux et al. 2005), TPO, Interleukin 3 (Jones, Kreil et al. 2005) und G-CSF (Kralovics, Teo et al. 2005) sind. Kralovics, Passamonti et al. (2005) führten Studien an *JAK2* V617F transfizierten BaF3 und UT-7/TPO Zellen durch. Die *JAK2* V617F transfizierten BaF3 Zellen wiesen selbst in Abwesenheit von Interleukin 3, nach Zugabe von

Serum, einen Überlebensvorteil, eine erhöhte Proliferationsrate und eine vermehrte Phosphorylierung von *JAK2* und STAT5 auf.

Die *JAK2* V617F Mutation kann in heterozygoter (ein mutiertes Allel und ein Wildtyp-Allel), homozygoter (2 mutierte Allele) und hemizygoter (ein mutiertes Allel, das andere Allel fehlt) Form auftreten. Vor allem bei PV- (Scott, Scott et al. 2006) aber auch bei PMF-Patienten werden homozygote *JAK2* V617F Träger beobachtet. Das Auftreten einer homozygoten *JAK2*-Mutation ist an einen sogenannten Heterozygotieverlust (LOH) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (9pLOH) gekoppelt. Bei einem Verlust der Heterozygotie handelt es sich um ein chromosomales Ereignis, bei dem ein komplettes Gen inklusive seiner angrenzenden Regionen verloren geht (Knudson 1996). Im Falle der *JAK2* V617F Mutation wird der LOH durch die mitotische Rekombination von homologen 9p Chromatiden bedingt. Die mitotische Rekombination ist ein häufiger Mechanismus bei der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bei soliden Tumoren (Pal, Wadey et al. 1990, Wadey, Pal et al. 1990, Hagstrom and Dryja 1999), nicht aber bei hämatologischer Neoplasien (Raghavan, Lillington et al. 2005). Die Transition der Heterozygotie zur Homozygotie stellt eine klonale Evolution der *JAK2* V617F Mutation dar, bei der die Punktmutation Val617Phe das erste und die mitotische Rekombination der homologen 9p Chromatiden das zweite molekulare Ereignis darstellen (Baxter, Scott et al. 2005).

Klinisch zeichnen sich die Träger der *JAK2* V617F Mutation durch eine höhere Komplikationsrate wie z.B. eine Transformation in eine sekundäre Myelofibrose, Hämorrhagien oder Thrombosen aus und erhalten häufiger zytoreduktive Therapien als *JAK2 wt* Patienten (Jones, Kreil et al. 2005).

Der fehlende Nachweis der Mutation in Kontrollgeweben wie z.B. Mundschleimhautzellen bestätigt die Annahme, dass es sich bei der *JAK2* V617F Mutation um eine somatische Mutation handelt (Baxter, Scott et al. 2005, Kralovics, Passamonti et al. 2005). Dennoch hat eine große schwedische Studie gezeigt, dass erstgradige Verwandte eines MPN-Patienten ein fünf- bis siebenfach erhöhtes Risiko besitzen eine MPN zu entwickeln (Landgren, Goldin et al. 2008). Im Jahr 2009 wurde zudem durch drei Arbeitsgruppen ein Keimbahn-Haplotyp beschrieben der das *JAK2*-Gen beinhaltet und mit der Entstehung sowohl der *JAK2* V617F Mutation als auch der MPN assoziiert ist. Das Risikoallel stellt eine dominante MPN-Prädisposition dar und erhöht das Risiko eine MPN zu erwerben um das drei- bis vierfache (Jones, Chase et al. 2009, Kilpivaara, Mukherjee et al. 2009, Olcaydu, Harutyunyan et al. 2009). Trotz dieser Beobachtungen bleibt der genaue Mechanismus über den das Risikoallel die Entwicklung einer MPN fördert und dessen klinische und therapeutische Bedeutung weiterhin unklar (Levine 2012).



**Abbildung 3:** Die Abbildung zeigt den Mechanismus der *JAK2* Aktivierung durch die *JAK2* Mutationen. a. Normale Aktivierung des *JAK2* Rezeptors über die Bindung eines Zytokins. b. Ligand-unabhängige Aktivierung der *JAK2*-Signalkaskade durch die *JAK2* V617F und *JAK2* Exon 12 Mutation. c. Thrombopoetin-unabhängige Aktivierung eines *MPL* W515L/K mutierten Thrombopoetinrezeptors mit konsekutiver Aktivierung der Signalwege *downstream* von *JAK2*. (Levine, Pardanani et al. 2007)

### 2.3.2 Weitere somatische Mutationen

Zum heutigen Zeitpunkt sind neben der *JAK2* V617F Mutation weitere somatische Mutationen bekannt die z.B. auf den Genen für Thrombopoetinrezeptoren (*MPL*= *myeloproliferative leukemia virus onkogene*), „*oncogene family member 2*“ (*TET2*), „*additional sex combs like 1*“ (*ASXL1*) und „*isocitrate dehydrogenase 1 & 2*“ (*IDH1/2*) zu finden sind (Hussein, Busche et al. 2012). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Mutationen mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert (Klampfl, Gisslinger et al. 2013, Nangalia, Massie et al. 2013).

Durch die systematische Sequenzierung aller Exone der Januskinasen bei *JAK2* V617F positiven PV-Patienten und Patienten mit idiopathischer Erythrozytose konnten Scott, Tong et al. (2007) somatische Deletionen, Insertionen und *missense* Mutationen im Exon 12 des *JAK2* Gens identifizieren (Levine 2012). *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen belegen, dass eine Mutation im Exon 12 eine konstitutive Aktivierung der JAK-STAT Signalkaskade und die Transformation hämatopoetischer Progenitorzellen bedingt. Patienten mit einer *JAK2* Exon 12 Mutation erkranken zu einem früheren Zeitpunkt, haben

höhere Hämoglobinwerte und niedrigere Thrombo- und Leukozytenwerte als Patienten mit einer *JAK2* Mutation im Exon 14. In der Knochenmarkshistologie zeigt sich bei den *JAK2* Exon 12 positiven PV-Patienten eine Steigerung der Erythropoese ohne den Nachweis einer gesteigerten Granulo- und Thrombopoese (Scott, Tong et al. 2007). Die *JAK2* Exon 12 Mutation ist vor allem bei PV-Patienten und Patienten mit idiopathischer Erythrozytose nachweisbar. Der fehlende Nachweis einer *JAK2* Exon 12 Mutation bei ET Patienten stimmt mit der Beobachtung überein, dass eine niedrige *JAK2* Expression eine Thrombozytose und eine hohe *JAK2* Expression eine Erythrozytose bedingen (Scott, Tong et al. 2007).

Im Jahr 2013 gelang es Klampfl, Gisslinger et al. (2013) somatische Mutationen im Calreticulin (*CALR*) Gen (19p13.2) zu identifizieren. Das Calreticulinprotein ist ein multifunktionelles Kalziumbindendes Chaperonprotein, welches hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Zellen zu finden ist (Tefferi and Barbui 2015). Nach der *JAK2* Mutation ist die *CALR* Mutation mit einer Frequenz von 73% bei den *JAK2*-negativen MPN-Patienten die zweithäufigste Mutation bei den *BCR-ABL*-negativen MPN. Insgesamt wurden 36 Deletionen und Insertionen im Exon 9 des *CALR* Gen detektiert. Ein Großteil der Mutationen war heterozygot und bedingt eine Verschiebung des Leserasters (*frameshift*). Durch den *frameshift* wird der negativ geladene C-Aminoterminus des Calreticulin durch ein positiv geladenes Arginin- und Methionin-reiches Polypeptid ersetzt. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine Zytokin-unabhängige Zellproliferation von *CALR* Typ I (52bp Deletion) transfizierten Ba/F3 Zellen. Ferner war eine erhöhte Phosphorylierung von STAT5 auch in Abwesenheit von IL3, in den transfizierten Ba/F3 Zellen messbar. Die Proliferation der transfizierten BaF3-Zellen konnte durch *JAK2*-Inhibitoren supprimiert werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass die JAK-STAT-Signalkaskade durch die *CALR* Mutationen auf eine bisher unbekannte Weise modifiziert wird (Klampfl, Gisslinger et al. 2013). Klampfl, Gisslinger et al. (2013) wiesen die *CALR*-Mutationen bei 67% der *JAK2* / *MPL* negativen ET- (n=289) und 88% der *JAK2* / *MPL* negativen PMF-Patienten (n=120) nach. Bei PV-Patienten konnten bisher keine Mutationen im *CALR*-Gen gefunden werden.

Klinisch zeichnen sich ET-Patienten mit Nachweis einer *CALR* Mutation im Vergleich zu *JAK2* V617F positiven ET Patienten durch ein jüngeres Erkrankungsalter, männliches Geschlecht, höhere Thrombozytenwerte, niedrigere Hämoglobin- und Leukozytenwerte und ein niedrigeres Thromboserisiko aus (Klampfl, Gisslinger et al. 2013, Nangalia, Massie et al. 2013, Rumi, Pietra et al. 2013, Rotunno, Mannarelli et al. 2014). *CALR* positive PMF-Patienten weisen ebenfalls höhere Thrombozytenwerte, ein besseres Risikoprofil, weniger Anämien / Leukozytosen und weniger Splicesomen Mutationen auf (Tefferi, Lasho et al. 2014).

Die weiteren somatischen Mutationen können in zwei Gruppen unterteilt werden (Nangalia, Massie et al. 2013). Die erste Gruppe umfasst aktivierende Mutationen des Thrombopoetin-Rezeptors (*MPL* = *myeloproliferative leukemia virus oncogene*) und die Inaktivierung von negativen Regulatoren der

Signaltransduktion wie z.B. den LNK-Proteinen (Pikman, Lee et al. 2006, Lasho, Pardanani et al. 2010).

Bei den *MPL* Mutationen handelt es sich um somatische Punktmutationen, die in den meisten Fällen auf Exon 10 im Codon 515 des Thrombopoetinrezeptor-Gens zu finden sind. Die *MPL* W515L und *MPL* W515K Mutationen sind die beiden häufigsten Mutationen im *MPL* Gen. Die Mutationen führen zu einem Austausch der Aminosäure Tryptophan gegen Leucin (W515L), Lysin (W515K) oder seltener zu Arginin (W515R), Serin (W515S) oder Alanin (W515A) und bedingen ebenfalls eine konstitutive Aktivierung der JAK-STAT Signalkaskade. Im Mausmodell induziert die Expression von *MPL* W515L einen MPN-Phänotyp mit einer geringen Latenzzeit bis zum Auftreten einer Thrombozytose oder Myelofibrose. Die Mutationen sind bei 5-10% der *JAK2* V617F negativen MPN nachweisbar und sprechen für das Vorliegen einer thrombozytischen MPN (ET / PMF) (Hussein, Bock et al. 2009, Pardanani, Lasho et al. 2011). Bei *JAK2* V617F negativen PMF-Patienten sind die *MPL* Mutationen in 10% der Fälle detektierbar. Zudem ist die *MPL*-Mutationslast bei den Patienten mit PMF in der Regel höher als bei den Patienten mit ET (Pardanani, Levine et al. 2006, Pikman, Lee et al. 2006). Die Klinik der *MPL*-positiven MPN unterscheidet sich nicht von der Klinik der *JAK2* V617F-positiven MPN.

2010 wurde eine *loss of function* Mutation bei zwei *JAK2* V617F / *MPL* negativen Patienten im LNK-Protein-Gen (*SH2B3*) identifiziert. Die LNK-Proteine gehören zur Familie der inhibitorischen Adapterproteine und besitzen eine negativ regulierende Wirkung auf die JAK-STAT Signalkaskade. Bei den Patienten mit LNK-Mutation konnte eine aberrante JAK-STAT-Aktivierung detektiert werden. Zudem war eine übermäßige Zytokin-Antwort der CD34+ Progenitorzellen nachweisbar (Oh and Gotlib 2010).

Die zweite Gruppe somatischer Mutationen umfasst solche innerhalb der epigenetischen Regulatoren der DNA-Methylierung (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) (Delhommeau, Dupont et al. 2009, Pardanani, Lasho et al. 2010, Abdel-Wahab, Pardanani et al. 2011, Stegelmann, Bullinger et al. 2011) und der Chromatin-Struktur (*EZH2*, *ASXL1*) (Carbuccia, Murati et al. 2009, Ernst, Chase et al. 2010).

Im Jahr 2009 gelang es zwei verschiedenen Arbeitsgruppen *missense*, *nonsense* oder *frameshift* Mutationen im *TET2* Gen auf Chromosom 4q24 zu identifizieren (Delhommeau, Dupont et al. 2009, Langemeijer, Kuiper et al. 2009). Die Mutationen können in allen kodierenden Regionen des *TET2* Gens über insgesamt 11 Exone verteilt vorkommen und bedingen ebenfalls einen *loss of function* (Delhommeau, Dupont et al. 2009). *TET2* und seine Homologen *TET1* und *TET3* katalysieren die Konversion von Methylcytosin zu Hydroxymethylcytosin (Tahiliani, Koh et al. 2009) und führen durch die Entfernung von Methylcytosin zu einer Demethylierung des Genoms (Tan and Wei 2011, Hussein, Busche et al. 2012). Bei Leukämie-Patienten mit Nachweis einer *TET2* Mutation ist eine erniedrigte DNA-Hydroxymethylierung (Ko, Huang et al. 2010) und eine erhöhte DNA-Methylierung (Figueroa, Abdel-Wahab et al. 2010) zu beobachten. Zudem induziert der *loss of function* eine

verminderte Differenzierung myeloischer Progenitorzellen, eine gesteigerte Aktivität hämatopoetischer Progenitorzellen und eine chronische myelo-monozytäre Leukämie *in vivo* (Moran-Crusio, Reavie et al. 2011, Quivoron, Couronne et al. 2011, Levine 2012). Die klinische und funktionelle Relevanz der *TET2* Mutationen bleibt bisher unklar (Oh and Gotlib 2010). Die Mutation kann bei ca. 11% aller MPN-Patienten nachgewiesen werden (Abdel-Wahab, Mullally et al. 2009, Delhommeau, Dupont et al. 2009, Tefferi, Pardanani et al. 2009).

Bei 8% der MPN-Patienten findet sich eine Mutation im *ASXL1*-Gen (*Additional Sex Combs like 1*-Gen). Das *ASXL1*-Gen ist auf dem Chromosom 20q11.1 lokalisiert und kodiert für ein Chromatin-bindendes Protein, welches eine stabile Repression der Genexpression und eine Verstärkung der Transkription vermittelt. Ferner stellt das *ASXL1*-Protein einen Ligand-abhängigen Koaktivator des Retinolsäurerezeptors dar (Tefferi and Vainchenker 2011). Bei den *ASXL1* Mutationen handelt es sich um *nonsense* oder *frameshift* Mutationen, die einen *loss of function* des Proteins bedingen. Die *ASXL1* und die *TET2* Mutation kommen mit einer ähnlichen Frequenz vor und werden bei den gleichen myeloischen Neoplasien beobachtet (Carbuccia, Murati et al. 2009, Gelsi-Boyer, Trouplin et al. 2009, Levine 2012).

Ferner wurden in den letzten Jahren immer wieder auftretende Mutationen bei den myeloischen Neoplasien beschrieben (Levine 2012), die sich auf den *IDH1/2*- (Mardis, Ding et al. 2009, Gross, Cairns et al. 2010, Marcucci, Maharry et al. 2010, Ward, Patel et al. 2010), *EZH2*- (Ernst, Chase et al. 2010, Nikoloski, Langemeijer et al. 2010), und *DNMT3A* Genen (Ley, Ding et al. 2010, Yan, Xu et al. 2011) befinden. Die Mutationen werden bei einem Teil der MPN-Patienten beobachtet und können zusätzlich zu einer *MPL* oder *JAK2* Mutation auftreten (Abdel-Wahab, Pardanani et al. 2011, Abdel-Wahab, Pardanani et al. 2011). Sie sind nicht MPN-spezifisch und werden z.B. auch im Rahmen einer akuten myeloischen Leukämie oder bei einem myelodysplastischen Syndrom beobachtet. Bei einem Teil der MPN-Patienten ist das Vorhandensein einer Mutation im *IDH1/2*-, *TET2*- und *DNMT3A*-Gen mit einer Transformation in eine akute myeloische Leukämie assoziiert (Abdel-Wahab, Manshouri et al. 2010). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die zusätzlichen somatischen Mutationen über eine Änderung des epigenetischen Zustands der hämatopoetischen Zellen, die Pathogenese der MPN beeinflussen und eine Transformation der Erkrankungen bedingen können (Levine 2012).

Darüber hinaus zeigten diverse Studien, dass die MPN nicht alleine auf einen intrinsischen Stammzelldefekt zurückzuführen sind, sondern auch durch Alterationen und / oder Mutationen innerhalb des hämatopoetischen *microenviroments* beeinflusst werden (Walkley, Olsen et al. 2007). Die Veränderungen des *microenviroments* haben sowohl einen Einfluss auf die Pathogenese der MPN als auch auf die Krankheitsprogression (Lataillade, Pierre-Louis et al. 2008). Das hämatopoetische *microenviroment* setzt sich aus löslichen und zellgebundenen Faktoren zusammen, die von einer Vielzahl nicht-hämatopoetischer Zellen wie z.B. Osteoblasten, Endothelzellen, Adipozyten und Nervenzellen in den Knochenmarksnischen produziert werden (Walkley, Shea et al. 2007).

### 2.3.3 Molekulare Unterschiede bei der PV, ET und PMF

Bei einer PV liegt die *JAK2* V617F Mutationslast in den meisten Fällen >50%. Diese Beobachtung ist mit einer homozygoten *JAK2* V617F Mutation vereinbar (Hussein, Bock et al. 2007). In transgenen Mausmodellen führt die hohe Expression von *JAK2* V617F zu einem PV-ähnlichen Phänotyp ohne den Nachweis einer Thrombozytose. Eine *JAK2* Exon 12 Mutation spricht ebenfalls für das Vorliegen einer PV. Der fehlende Nachweis einer *JAK2* Exon 14 und Exon 12 Mutation machen eine PV, abgesehen von einigen seltenen Mutationen und Keimbahndefekten (Skoda 2010), unwahrscheinlich.

Im Mausmodell induziert eine geringe Expression von *JAK2* V617F einen ET-ähnlichen Phänotyp. Hussein, Bock et al. (2007) zeigten in ihren Mutationsanalysen, dass eine der ET entsprechende reine megakaryozytäre Proliferation nicht mehr als 50% mutierte Allele im Sinne einer heterozygoten Mutation aufweist. Bei der präfibrotischen Phase einer PMF konnte die Allellast über 50% betragen.

Auch der Nachweis einer *MPL*- (Pardanani, Levine et al. 2006, Guglielmelli, Pancrazzi et al. 2007, Beer, Campbell et al. 2008, Vannucchi, Antonioli et al. 2008) sowie einer *CALR*-Mutation (Klampfl, Gisslinger et al. 2013) sprechen für eine thrombozytische MPN-Form (ET, post-ET-MF, PMF). Dennoch konnten Pardanani, Lasho et al. (2011) bei PV- und post-PV-MF-Patienten (n=168) in 1,2% der Fälle eine *MPL*-Mutation in Kombination mit einer *JAK2* V617F Mutation nachweisen.

Diverse Studien legen nahe, dass ca. 20% der ET-Patienten *triple* negativ sind (*JAK2* V617F-, *CALR*-, *MPL*-) (Wolanskyj, Lasho et al. 2005, Tefferi, Thiele et al. 2014).

**Tabelle 1:** Vorkommen der *JAK2* V617F, *JAK2* Exon 12, *MPL*- und *CALR*-Mutationen bei der PV, ET und PMF

MPN-Entität	<i>JAK2</i> V617F Mutation	<i>JAK2</i> Exon 12 Mutation	<i>MPL</i> Mutationen	<i>CALR</i> Mutationen
<b>PV</b>	> 95%	3%	selten	selten
<b>ET</b>	55%	selten	4%	15-24%
<b>PMF</b>	65%	selten	8%	25-35%

(Tefferi and Barbui 2015)

## 2.4 Epidemiologie und Klinik der MPN

Bei den MPN handelt es sich um Erkrankungen des höheren Lebensalters. Ein Erkrankungsbeginn in jungen Jahren ist äußerst selten und mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert. Aufgrund einer niedrigen Krankheitsprävalenz ist es schwierig eine Aussage über umweltbedingte Auslöser oder über einen auslösenden Lebensstil zu machen. Die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. 14 Jahre bei der PV, ca. 20 Jahre bei der ET und ca. sechs Jahre bei der PMF (Tefferi, Guglielmelli et al. 2014).

Die meisten Patienten sind bei Erkrankungsbeginn oligo- bis asymptomatisch, sodass der klinische Verdacht einer MPN häufig anhand von pathologisch veränderten Blutwerten gestellt wird. Die seltenen viszerale Thrombosen können eine mögliche Erstmanifestation darstellen. Kiladjian, Cervantes et al. (2008) wiesen in 45% der Budd-Chiari-Syndrome (Leberventhrombose) und 34% der Pfortaderthrombosen eine *JAK2* V617F Mutation in den Granulozyten nach. Bei Patienten mit histologisch nachweisbaren neoplastischen Veränderungen des Knochenmarks war die Mutation sogar in 96,5% der Fälle detektierbar.

Der Krankheitsverlauf der MPN wird vor allem durch eine autonom gesteigerte Hämatopoese bestimmt. Typische Komplikationen die im Rahmen einer PV oder ET auftreten sind z.B. Thrombosen oder Hämorrhagien (Baxter, Scott et al. 2005). Die PMF sowie sekundäre Fibrosen im Rahmen einer post-ET/PV-Myelofibrose sind durch eine Panzytopenie und (Hepato-) Splenomegalie gekennzeichnet. Eine Transformation in eine akute myeloische Leukämie oder ein myelofibrotisches Syndrom ist bei allen Formen der MPN möglich.

### 2.4.1 Polyzythämia vera

Bei Erstdiagnose sind die meisten Patienten zwischen 60 und 65 Jahren alt. Die Lebenserwartung ist bei gut eingestellten Blutwerten gegenüber der Normalbevölkerung nur leicht reduziert (Gesamtmortalität pro Jahr 2,9/100 Patienten) (DGHO 2014).

Der Erkrankungsverlauf einer PV wird in eine chronische Phase und eine progrediente Spätphase unterteilt. Während der chronischen Phase, die bis zu 20 Jahre andauern kann, dominiert eine gesteigerte Erythropoese. In der progredienten Spätphase folgt ein Übergang in eine sekundäre Myelofibrose und / oder in eine Myelodysplasie oder akute myeloische Leukämie. Das 10 Jahres-Risiko einer Transformation in eine AML beträgt <5% und in eine Myelofibrose <10% (Crisa, Venturino et al. 2010).

Die Post-PV-Myelofibrose zeichnet sich vor allem durch eine extramedulläre Hämatopoese und eine progrediente Splenomegalie aus. (1995)

Die möglichen Symptome einer PV sind durch die Polyglobulie und die damit einhergehenden Mikrozirkulationsstörungen und Thrombembolien bedingt. Am häufigsten treten

Durchblutungsstörungen an Händen und Füßen, neurologische Symptome in Form von Schwindel, Kopfschmerzen und Sehstörungen sowie ein aquagener Pruritus (71,8% der Patienten) auf.

Die Wahrscheinlichkeit einer potenziell lebensbedrohlichen arteriellen oder venösen Thrombembolie beträgt 3-5% pro Jahr. Thrombembolien stellen bei unbehandelten PV-Patienten die Haupttodesursache dar (1995). Als Ursache wird eine thromboxaninduzierte Aktivierung von Thrombozyten vermutet (Landolfi, Marchioli et al. 2004). Landolfi, Ciabattini et al. (1992) konnten bei PV-Patienten in vitro eine erhöhte Thromboxansynthese messen.

Anzeichen für eine Progression der Myeloproliferation können z.B. eine Zunahme der Milzgröße oder eine symptomatische Splenomegalie sein. Weitere Symptome einer PV sind z.B. Ohrensausen, Tinnitus, Plethora, Erythromelalgie, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Nachtschweiß, Wadenkrämpfe, Hypertonie, Dyspnoe und Missempfindungen der Haut. Durch die gesteigerte Hämatopoese kommt es ebenfalls häufig zu Knochen- und Gliederschmerzen.

Bei Patienten mit Nachweis einer homozygoten *JAK2* V617F Mutation werden aggressivere Krankheitsverläufe beobachtet. Die homozygoten Träger zeichnen sich durch höhere Leukozyten- / Hämatokritwerte, eine größere Milz und eine höhere Rate an aquagenem Pruritus aus. Des Weiteren wird bei homozygoten Trägern häufiger ein Übergang in eine sekundäre Myelofibrose beobachtet (Vannucchi, Antonioli et al. 2007).

#### 2.4.1.1 Diagnostische Kriterien der PV

Für die Diagnosestellung einer PV werden die in Tabelle 2 aufgeführten WHO-Kriterien angewendet. Das Vorliegen einer Erythrozytose mit begleitender Leukozytose und/oder Thrombozytose und/oder Splenomegalie und der Nachweis einzelner Erythroblasten im Blutaustriech machen eine PV klinisch sehr wahrscheinlich. Von der deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie werden bei Verdacht auf eine PV folgende Untersuchungen empfohlen (DGHO 2014):

- **Molekulargenetik:** *JAK2* V617F Mutation, wenn negativ Screening auf *JAK2* Exon 12-Mutation, BCR-ABL-Fusionsgen nur, wenn keine Mutation im *JAK2*-Gen
- **EPO-Konzentration** im Serum
- **Knochenmark:** Aspirationszytologie und Histologie mit Eisen- und Faserfärbung
- Evtl. Hämoglobinanalyse, Sauerstoffbindungskurve, molekulargenetische Untersuchung zum Ausschluss hereditärer Formen (Mutation im EPO-Rezeptor, im von Hippel-Lindau-Gen sind nur bei Ausschluss einer PV und fehlenden Hinweisen auf eine reaktive Erythrozytose sinnvoll)
- Falls verfügbar, Bestimmung des Erythrozyten- und Plasmavolumens
- Falls verfügbar, endogene erythroide Kolonien in vitro

Des Weiteren sollte eine Abgrenzung zu reaktiven sekundären Erythrozytosen z.B. im Rahmen kardiopulmonaler Erkrankungen und den seltenen nicht-den-MPN-zugehörigen primären Erythrozytosen erfolgen. Vor allem bei Patienten mit Nachweis einer *JAK2* Exon 12 Mutationen ist diese Abgrenzung ohne molekulargenetische Untersuchung häufig nicht eindeutig möglich, da sich die Patienten mit *JAK2* Exon 12 Mutation lediglich mit einer isolierten Polyglobulie und erniedrigten EPO-Spiegeln präsentieren können (Scott, Tong et al. 2007).

Ferner kann die hyperproliferative Frühphase einer PMF sowohl klinisch und laborchemisch als auch histologisch einer PV ähneln. Auch die Abgrenzung gegenüber einer ET kann sich in manchen Fällen schwierig gestalten. Die meisten dieser „Übergangsfälle“ sind *JAK2* V617F positiv.

Laborchemisch sind bei einer PV zusätzlich eine erhöhte alkalische Leukozyten-Phosphatase (LAP) und eine vermehrte Expression von PVR-1-mRNA, ein Glykosylphosphatidylinositol, messbar (M. Dietl 2008).

**Tabelle 2:** WHO Kriterien, Polyzythämia vera (2008)

Major Kriterien	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hämoglobin &gt;18,5g/dl bei Männern, &gt;16,5g/dl bei Frauen oder andere Hinweise auf ein erhöhtes Erythrozytenvolumen</li> <li>2. <i>JAK2</i> V617F Mutation oder andere funktionell vergleichbare Mutationen wie <i>JAK2</i> Exon 12 Mutation</li> </ol>
Minor Kriterien	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hyperzellularität im Knochenmark mit Proliferation aller 3 Zellreihen</li> <li>2. Serumerythropoetin erniedrigt</li> <li>3. EEC-Bildung* in vitro</li> </ol>

Für die Diagnose sind 2 Major- und 1 Minorkriterium bzw. das erste Majorkriterium und 2 Minorkriterien notwendig

\*EEC-Bildung = Endogene erythroide Kolonie

Die Erythrozytenmasse wird mittels <sup>51</sup>Cr-markierten Erythrozyten durchgeführt und erlaubt eine Unterscheidung zwischen Polyglobulie und Pseudopolyglobulie. In Deutschland wird die Methode nicht standardmäßig angewendet.

#### 2.4.1.2 Histologie der PV

Bei einer PV zeigt sich histologisch ein hyperzelluläres Knochenmark mit einer trilineären Hyperplasie und einem fast vollständigen Schwund der Adipozyten (Hussein, Bock et al. 2007). Zusätzlich sind atypische und polymorphe Megakaryozyten nachweisbar.

In den frühen Stadien einer PV ist vor allem die Megakaryopoese gesteigert, sodass eine Abgrenzung gegenüber einer ET sich histologisch als schwierig erweisen kann. Eine Post-PV-Myelofibrose ist nicht von einer PMF im fibrotischen Stadium zu unterscheiden. Bei Diagnosestellung weisen ca. 10% der Patienten bereits Zeichen einer Myelofibrose auf.

## 2.4.2 Essentielle Thrombozythämie

Die Inzidenz einer ET liegt bei ca. 0,1-0,5/100.000 pro Jahr und tritt häufiger bei Frauen als bei Männern auf (M. Dietl 2008). Das 10 Jahres-Risiko einer Transformation in eine Myelofibrose oder AML beträgt <1% (Tefferi 2008). Den Leitbefund der ET stellt eine langsam progrediente Thrombozytose im peripheren Blut dar (DGHO, 2014). Im Krankheitsverlauf kann es sowohl zu Hämorrhagien als auch zu thrombembolischen Ereignissen kommen. Die Thrombembolien können in Form von Mikrozirkulationsstörungen z.B. im Bereich der Akren oder als venöse und/oder arterielle Thrombosen z.B. in den Koronarien oder viszeralen Gefäßen auftreten. Hämorrhagien werden vor allem bei sehr hohen Thrombozytenwerten, bedingt durch einen Verlust an von-Willebrand-Faktor Multimeren (M. Dietl 2008), beobachtet. Der Übergang einer ET in eine PV ist gekennzeichnet durch einen Anstieg des Hämatokritwertes und durch das Auftreten von PV-typischen Symptomen wie z.B. einem aquagenen Pruritus. Träger der *JAK2* V617F Mutation besitzen ein höheres Risiko für eine Thrombose / Leukozytose, sind bei Diagnosestellung älter und haben eine höhere Transformationsrate in eine PV, als *JAK2 wt* Patienten (Antonioli, Guglielmelli et al. 2005, Wolanskyj, Lasho et al. 2005, Cheung, Radia et al. 2006). Die Überlebensrate der ET-Patienten wird durch den *JAK2/CALR* Mutationsstatus nicht beeinflusst (Tefferi and Barbui 2015).

### 2.4.2.1 Diagnostische Kriterien einer ET

Für die Diagnosestellung einer ET müssen die WHO-Kriterien (Tabelle 3) erfüllt werden. Nach Ausschluss sekundärer Thrombozythämien, sollten eine Beurteilung der Knochenmarkshistologie und molekulargenetische Untersuchungen erfolgen. Ursachen für eine sekundäre Thrombozythämie können z.B. ein Eisenmangel, ein Zustand nach Splenektomie, Entzündungen oder Bindegewebserkrankungen sein. Im Blutausstrich weisen viele ET-Patienten eine Anisozytose der Thrombozyten auf.

**Tabelle 3:** modifizierte WHO-Kriterien, Essentielle Thrombozythämie

- 
1. Thrombozytenzahl anhaltend  $\geq 450 \times 10^9/l$
  2. Die Knochenmarksbiopsie zeigt die Proliferation hauptsächlich der megakaryozytären Reihe mit Vermehrung von vergrößerten reifen Megakaryozyten. Keine signifikante Vermehrung oder Linksverschiebung der neutrophilen Granulozytopoese oder Erythropoese
  3. Fehlen von WHO-Kriterien für eine PV, eine PMF oder eine *BCR-ABL1*-positive CML, Myelodysplasie oder für anderen myeloische Dysplasien
  4. Nachweis von *JAK2* V617F oder anderen klonalen Markern (*MPL/CALR*-Mutationen), bzw. bei Fehlen von *JAK2* V617F kein Hinweis auf reaktive Thrombozytose
- 

Für die Diagnose müssen alle vier Kriterien erfüllt sein

---

### 2.4.2.2 Histologie der ET

Histologisch zeigt sich bei der ET eine gesteigerte Megakaryopoese mit fehlendem Nachweis einer Myelofibrose oder signifikant gesteigerten Erythro- und Granulopoese. Die Megakaryozyten sind in lockeren Clustern angeordnet, deutlich vergrößert und besitzen hyperlobulierte hirschgeweihartige Zellkerne (Hussein, Bock et al. 2007). Bei der ET ist zudem im Gegensatz zur PMF keine erhöhte Thrombospondin1-Expression nachweisbar (Muth, Engelhardt et al. 2011).

### 2.4.3 Primäre Myelofibrose

Die Inzidenz der PMF liegt zwischen 0,4 und 0,73 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Die PMF hat im Vergleich zu den anderen MPN-Entitäten die schlechteste Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von ca. sechs Jahren (Tefferi, Guglielmelli et al. 2014). In Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit Nachweis einer *JAK2* V617F Mutation eine geringere Überlebensrate haben als *JAK2 wt* Patienten (Campbell, Griesshammer et al. 2006). Die PMF führt im Krankheitsverlauf unaufhaltsam zu einer transfusionsbedürftigen Anämie und einer durch die extramedulläre Hämatopoese bedingten Organomegalie (M. Dietl 2008).

Um die Therapieentscheidung zu vereinfachen und um Patienten identifizieren zu können, die von einem aggressiven Therapieregime profitieren würden, hat die *International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment* (IWG-MRT) den IPSS Prognose Score entwickelt. Im IPSS Score werden die folgenden Punkte berücksichtigt (Cervantes, Dupriez et al. 2009):

- Alter > 65 Jahre
- Konstitutionelle Symptome
- Hämoglobin < 10 g/dl, Leukozyten > 25 T/ $\mu$ l
- Blasten im Blut  $\geq$  1%

Je nach Punktzahl werden die Patienten in 4 Prognosegruppen eingeteilt:

**Tabelle 4:** IPSS Prognose Score

Punkte	Prognosegruppe	Mediane Überlebenszeit (Monate)
0	Niedrigrisiko	135
1	Intermediäres Risiko 1	95
2	Intermediäres Risiko 2	48
$\geq$ 3	Hochrisiko	27

Modifiziert nach Cervantes, Dupriez et al. (2009)

Klinisch zeichnet sich die PMF durch das gleichzeitige Auftreten von konstitutionellen Symptomen wie z.B. Fatigue oder Gewichtsverlust, einer Splenomegalie und einer Anämie aus. Weitere klinische Manifestationen sind Kachexie, Thrombosen und / oder Hämorrhagien. Durch Einsetzen der extramedullären Hämatopoese können zudem eine progrediente Hepatosplenomegalie und

Knochenschmerzen auftreten (Tefferi 2000). Bei massiver Splenomegalie werden Milzinfarkte mit Fieber und / oder eine Autosplenektomie beobachtet. Ein aquagener Pruritus wird von PMF-Patienten angegeben, ist aber deutlich seltener als bei einer PV. In fortgeschrittenen Stadien kommt es durch Erliegen der medullären Hämatopoese zu einer Panzytopenie.

#### 2.4.3.1 Diagnostische Kriterien einer PMF

Die Diagnosestellung einer PMF erfolgt histologisch. Für die Festlegung des Fibrosegrads, werden die in Tabelle 5 genannten WHO-Kriterien angewendet. Eine Abgrenzung gegenüber den anderen MPN-Entitäten ist für eine optimale Therapie entscheidend.

Die DGHO empfiehlt bei Verdacht auf eine PMF bzw. auf eine post-ET-Myelofibrose oder post-PV-Myelofibrose folgende Untersuchungen:

- **Gezielte Anamnese nach:** Splenomegalie bedingten Symptomen wie z.B. linksseitige Oberbauchschmerzen, Anämie und konstitutionellen Symptomen (Fatigue, Fieber, Knochenschmerzen, Nachtschweiß und Gewichtsverlust), thrombembolischen Ereignissen, Mikrozirkulationsstörungen und Hämorrhagien
- **Labor:** Blutbild inkl. Differenzialblutbild, Retikulozyten, LDH, Ferritin, Harnsäure, Quick, PTT, AST, ALT,  $\gamma$ -GT, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Coombs-Test, Haptoglobin, Serumtryptase v.a. bei Verdacht auf systemische Mastozytose als Differenzialdiagnose
- **Molekulargenetik:** *JAK2* V617F, *MPL* W515K/L, *Calreticulin* (*BCR-ABL* nur wenn eine CML als Differenzialdiagnose in Frage kommt)
- **Zytogenetik**
- **Knochenmark:** Aspirationszytologie und Histologie mit Eisen- und Faserfärbung
- Körperliche Untersuchung und Oberbauchsonographie

In der präfibrotischen Phase der PMF zeigt sich im Blutbild eine Thrombozytose mit begleitender Anämie ohne adäquaten Anstieg der absoluten und relativen Retikulozytenzahlen. Im Krankheitsverlauf ist regelmäßig eine Panzytopenie mit laborchemisch nachweisbarem Anstieg der LDH und Harnsäure als Ausdruck einer ineffektiven Erythropoese nachweisbar. Im Blutausschlag zeigt sich ein leukoerythroblastisches Bild welches durch das Vorhandensein von Normoblasten und einer Linksverschiebung der Granulozyten im peripheren Blut gekennzeichnet ist. Zusätzlich können eine Poikilozytose, eine Anisozytose und eine Tränenropfen-Form der Erythrozyten vorkommen (M. Dietl 2008). In der körperlichen Untersuchung zeigen sich Zeichen einer Anämie und/oder eine (Hepato-) Splenomegalie. Die Splenomegalie ist zu Beginn der Erkrankung durch die vermehrt anfallenden Blutzellen bedingt. Im Verlauf ist die Progression der Milz- und Lebergröße auf eine Zunahme der extramedullären Hämatopoese zurückzuführen. Die Knochenmarksaspiration kann eine *Punctio sicca*

ergeben. Die *Punctio sicca* bezeichnet einen Zustand bei dem bei der Knochenmarkspunktion keine Aspirationszytologie gewonnen werden kann. Als histologisches Korrelat zeigt sich in der Knochenmarksstanze eine ausgeprägte Myelofibrose (M. Dietl 2008).

Bei Fehlen von klonalen Markern sollte eine Abgrenzung zu den sekundären Myelofibrosen erfolgen. Sekundäre Myelofibrose können z.B. nach Infektionen, bei Autoimmunerkrankungen, bei toxischen Myelopathien oder auch im Rahmen anderer Neoplasien auftreten.

**Tabelle 5:** WHO-Kriterien, Primäre Myelofibrose

---

Hauptkriterien	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Typische Knochenmarkshistologie für die PMF nach den WHO-Kriterien</li><li>2. Fehlen von WHO-Kriterien für eine PV, eine <i>BCR-ABL1</i> positive CML, ein MDS oder für andere MPN</li><li>3. <i>JAK2</i>-Mutation oder <i>MPL</i> W515K/L-Mutation oder falls kein klonaler Marker nachweisbar kein Hinweis auf eine sekundäre Myelofibrose</li></ol>
Nebenkriterien	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Leukoerythroblastisches Blutbild</li><li>2. Erhöhte LDH-Werte</li><li>3. Anämie</li><li>4. Palpable Splenomegalie</li></ol>

---

Für die Diagnose müssen alle drei Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien erfüllt sein

Die Calreticulin-Mutation wird demnächst als diagnostischer Marker in die WHO-Definition aufgenommen werden

---

**Tabelle 6:** WHO Kriterien, Post-ET/PV-MF

---

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dokumentation einer vorherigen Diagnose einer ET /PV nach WHO-Kriterien</li><li>2. Fibrose Grad 2 bis 3 gemäß der europäischen Definition auf einer 0-III-Skala</li><li>3. Nebenkriterien<ol style="list-style-type: none"><li>a. Anämie oder mindestens 2 g/dl unter dem Basishämoglobinspiegel oder bei einer PV nicht mehr erforderliche Phlebotomie</li><li>b. Ein leukoerythroblastisches Differenzialblutbild</li><li>c. Zunehmende Splenomegalie, definiert als Zunahme der tastbaren Splenomegalie um &gt;5cm Abstand vom linken Rippenbogen oder das Auftreten einer neu tastbaren Splenomegalie</li><li>d. Erhöhte LDH-Werte (gilt nur für ET)</li><li>e. Auftreten von mehr als einem von 3 allgemeinen Symptomen: &gt;10% Gewichtsverlust in 6 Monaten, Nachtschweiß, unerklärtes Fieber (&gt;37,5°C)</li></ol></li></ol>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

### 2.4.3.2 Histologie der PMF

In der präfibrotischen Phase einer PMF zeigt sich histologisch ein hyperzelluläres Knochenmark mit Betonung der Megakaryo- und Granulopoese und einer Verminderung der Erythropoese. Die in sogenannten Clustern angeordneten Megakaryozyten, weisen eine gestörte Kern-Plasma-Relation mit knolligen/wolkigen und/oder irregulär gefalteten Kernen auf. Bereits in der frühen hyperproliferativen Phasen sind pathologische Neovaskularisationen nachweisbar (Lataillade et al., 2008).

In der Phase der Fibrose zeigt sich ein zunehmender fibrotischer Umbau des Knochenmarks, eine gesteigerte Angiogenese und eine aberrante Synthese von Knochenmarkmatrixproteinen (Tefferi 2005). Der Fibrosegrad wird in vier Stadien unterteilt. Die Bestimmung der Faserdichte sollte in einer hämatopoetischen Region des Knochenmarks erfolgen. Der fibrotische Umbau des Knochenmarks ist durch eine Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen sowie durch eine vermehrte Ablagerung verschiedener Glykoproteine wie z.B. Kollagen Typ I, III, IV und VI, Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Tenascin bedingt. Diese Anhäufung ist unter anderem durch eine exzessive Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den malignen Zellklonen und aus den nekrotischen Megakaryozyten bedingt. Auf molekularer Ebene sind in den fortgeschrittenen Stadien einer PMF eine Überexpression von Genen, die an der Synthese von extrazellulärer Matrix, an Matrix-Remodellingprozessen und an der zellulären Adhäsion und Motilität beteiligt sind wie z.B. der *protein tyrosin kinase 2 (PTK2)*, des *transforming growth factor  $\beta$  typ II rezeptor (TGFB2)* und des *motility related protein 1 (CD9 molecule)* messbar. Diese Gene stellen mögliche Zielstrukturen für neue Therapien der PMF dar (Bock, Muth et al. 2009).

Eine Post-ET/PV-Myelofibrose ist histologisch nicht von einer PMF zu unterscheiden. Die Diagnose einer post-ET/PV-Myelofibrose wird ebenfalls anhand der WHO-Kriterien (Tabelle 6) gestellt. Für die Diagnosestellung müssen alle Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien erfüllt werden.

**Tabelle 7:** WHO-Kriterien für die Knochenmarksfibrose

Grading	Beschreibung
MF-0	Verstreutes, lineares Retikulin ohne Überkreuzungen, entsprechend normalem Knochenmark
MF-1	Loses Retikulinnetzwerk mit vielen Überkreuzungen, speziell in perivaskulären Regionen
MF-2	Diffuse und dichte Retikulinvermehrung mit extensiven Überkreuzungen, gelegentlich mit fokalen Bündeln von Kollagen und/oder fokaler Osteosklerose
MF-3	Diffuse und dichte Retikulinvermehrung mit extremen Überkreuzungen und groben Kollagenbündeln, oft assoziiert mit Osteosklerose

## 2.5 Therapie der MPN

Die meisten MPN-Patienten werden in palliativer Intention therapiert. Bei sehr jungen Patienten mit aggressivem Krankheitsverlauf besteht die Möglichkeit einer kurativen allogenen Stammzelltransplantation. Die Therapieoptionen der MPN setzen sich aus Maßnahmen zur Symptomkontrolle und einer Zytoreduktion zusammen. Das oberste therapeutische Ziel ist es, neben der Prävention lebensbedrohlicher thrombembolischer Ereignisse, den Übergang in eine Myelofibrose, in ein MDS oder in eine akute Leukämie zu verhindern bzw. hinauszuzögern (DGHO, 2014).

### 2.5.1 Maßnahmen zur Symptomkontrolle

#### 2.5.1.1 Allgemeine Maßnahmen

Aufgrund eines erhöhten Thrombembolierisikos sollte auf ein Normalgewicht, regelmäßige Bewegung, eine ausreichende tägliche Trinkmenge und das Tragen von Reisekompressionsstrümpfen geachtet werden. Zudem sollte langes Sitzen vermieden und die Behandlung weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren und Erkrankungen eingeleitet werden (DGHO 2014).

Eine altbewährte Methode zur Behandlung einer PV ist die Phlebotomie. Bei Therapiebeginn werden 250 bis 500ml Blut in zwei- bis dreitägigen Abständen abgelassen. Im Therapieverlauf wird die Aderlass-Frequenz an den Hämatokritwert angepasst. Ziel der Phlebotomie ist es durch Erniedrigung des Hämatokritwertes eine Senkung der Blutviskosität herbeizuführen. Als Zielwert wird ein Hämatokritwert unterhalb von 45% angestrebt (DGHO 2014). Marchioli, Finazzi et al. (2013) konnten in der CYTO-PV-Studie zeigen, dass eine strenge Einstellung des Hämatokritwertes unter 45%, einer Einstellung zwischen 45 und 50%, in Bezug auf die Mortalität durch kardiovaskuläre und andere thrombembolische Ereignisse, signifikant überlegen ist. In die Studie wurden PV-Patienten eingeschlossen, die mit Phlebotomie und / oder Hydroxyurea behandelt werden. In dem Arm mit der strengen Einstellung der Hämatokrits unter 45% befanden sich mehr Patienten, die mit Hydroxyurea bzw. einer höheren Dosis Hydroxyurea behandelt wurden. Bei diesen Patienten konnten niedrigere Leukozytenwerte gemessen werden als in dem Arm mit dem höheren Hämatokrit-Zielwert. Diese Beobachtung legt einen zusätzlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von thrombembolischen Ereignissen und der Anzahl der Leukozyten im Blut nahe. Der bei der Phlebotomie obligat auftretende Eisenmangel sollte nicht substituiert werden. Eine weitere Möglichkeit die Erythrozytenmasse auf mechanische Weise zu verringern ist die Erythrozytaphrese. Dieses Verfahren ist jedoch nur in speziellen Zentren verfügbar (DGHO 2014).

Bei Patienten mit massiver symptomatischer Splenomegalie kann eine (Teil-)Splenektomie in Erwägung gezogen werden. Eine Reduktion des Milzvolumens kann operativ oder durch Bestrahlung der Milz erfolgen. Eine komplette Splenektomie geht jedoch mit einer hohen Morbidität einher.

### 2.5.1.2 Medikamentöse Therapie

Um das Risiko arterieller Thrombosen zu minimieren, wird nach Ausschluss von Kontraindikationen, die Gabe von 100 mg Acetylsalicylsäure (ASS) pro Tag empfohlen. Kontraindikationen sind z.B. eine bekannte hämorrhagische Diathese oder eine positive Ulkusanamnese. Bei Patienten mit Thrombozytenwerten über 1-1,5 Mio./ $\mu$ l sollte vor Beginn einer ASS-Therapie eine zytoreduktive Therapie erfolgen. Bei massiv gesteigerten Thrombozytenwerten  $>1-1.5$  Mio/ $\mu$ l kann ein Verlust an von-Willebrand-Faktor Multimeren beobachtet werden, der mit der Gefahr lebensbedrohlicher Hämorrhagien einhergeht (M. Dietl 2008).

### 2.5.2 Zytoreduktive Therapieformen

Die Einleitung einer zytoreduktiven Therapie wird bei Zeichen einer starken Myeloproliferation, einem hohen Thrombembolierisiko und weiteren nicht kontrollierbaren Symptomen in Betracht gezogen. Ein Anstieg der Thrombozyten über 600T/ $\mu$ l und/oder Leukozyten über 25T/ $\mu$ l oder eine progrediente Splenomegalie deuten auf eine progressive Myeloproliferation hin. Bei PV-Patienten können zudem eine hohe Aderlassbedürftigkeit, eine leukoerythroblastisches Blutbild oder Dakryozyten im peripheren Blut auf eine hohe Krankheitsaktivität bzw. die Transformation in ein MDS, eine Leukämie oder eine post-PV-Myelofibrose hinweisen.

Hydroxyurea ist die Standardtherapie zur Behandlung der MPN. Hydroxyurea hemmt die Ribonukleotidreduktase und gehört zu der Gruppe der Antimetaboliten (Karow/Lange-Roth 2011). Die deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie empfiehlt eine Initialdosis von 15-20 mg/kg KG/Tag. Im weiteren Verlauf wird die Dosis an die Blutwerte angepasst. *JAK2* V617F positive ET-Patienten zeigen ein besseres Ansprechen auf Hydroxyurea als *JAK2 wt* Patienten. Bei einer Therapie mit Anagrelid wird dieser Effekt nicht beobachtet (Campbell, Scott et al. 2005). Aufgrund eines nicht ausgeschlossenen leukomogenen Risikos und / oder dem Risiko eventueller Zweitmalignome, sollte ein zurückhaltender Einsatz von Hydroxyurea bei Patienten  $<60$  Jahren erfolgen (Kiladjian, Chevret et al. 2011).

Bei Versagen oder Unverträglichkeit der Standardtherapie und bei jungen Patienten kann eine Therapie mit Interferon-alpha oder pegyliertem Interferon eingesetzt werden. Die Interferone sind für diese Indikation jedoch nicht zugelassen. Bei ET-Patienten ist bei einer Interferontherapie eine Reduktion der *CALR*-Mutationslast nachweisbar (Cassinat, Verger et al. 2014).

Anagrelid gehört zu der Gruppe der Imidazolin-Verbindungen und hat einen bisher unbekanntem hemmenden Einfluss auf Megakaryozyten im Knochenmark. Der Wirkstoff kann als Monotherapie oder in Kombination mit Hydroxyurea oder Interferon-alpha bei nicht-kontrollierbaren Thrombozytosen verabreicht werden. Durch Anagrelid kann es zu einem sehr schnellen Abfall der Thrombozyten kommen, weshalb auf eine zeitgleiche Therapie mit ASS 100 mg verzichtet werden sollte.

Eine spezifische Form der zytoreduktiven Therapien stellen die Tyrosinkinaseinhibitoren dar. Bei den Philadelphia-Chromosom-negativen MPN ist der Einsatz der Tyrosinkinaseinhibitoren nicht an einen positiven Mutationsstatus gekoppelt. Die *JAK2*-Inhibitoren binden gleichermaßen an mutierte und nicht mutierte *JAK2*-Proteine. Als Nebenwirkung kann es durch die unselektive Blockade zu massiven und therapielimitierenden Zytopenien kommen. Imantinib ist (Glivec ®, Novartis) der bekannteste Vertreter der *JAK*-Inhibitoren und wird seit der Zulassung 2001 in Europa zur Therapie der Philadelphia-Chromosom+ CML erfolgreich eingesetzt.

Die *JAK2*-Inhibitoren werden in drei Gruppen unterteilt:

- *JAK1/JAK2* Inhibitoren z.B. Ruxolitinib
- *JAK2/FTL3* Inhibitoren z.B. SAR302503, SB1518
- *JAK1* Inhibitoren z.B. CYT387

Ruxolitinib ist seit 2012 für die Behandlung der PMF, PV und Post-PV/ET-MF zugelassen.

## 2.6 Ziele der Arbeit

- 1) Ermittlung des Mutationsstatus (*JAK2* V617F, *MPL* W515L, *CALR*) in einem Patientenkollektiv mit myeloproliferativen Neoplasien aus der Gruppe der PV, PMF und ET an Gesamt-DNA aus Beckenkammtrepanaten
- 2) Ermittlung der analytischen Sensitivität beim Nachweis von *JAK2* V617F mittels Schmelzpunktanalyse und Pyrosequencing - ein Methodenvergleich
- 3) Qualitativer und quantitativer Nachweis der *JAK2* V617F Mutation in mikrodissektierten Zellen unterschiedlicher myeloetischer Zelllinien bei Patienten mit PV, PMF und ET mittels Schmelzpunktanalyse und Pyrosequencing
- 4) Qualitativer und quantitativer Nachweis der *JAK2* V617F Mutation in mikrodissektierten T-Lymphozyten bei Patienten mit PV, PMF und ET mittels Schmelzpunktanalyse und Pyrosequencing

## 3 Material und Methoden

---

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Studie standen uns retrospektiv Beckenkammtrepanate von 22 Patienten aus den Jahren 2004 bis 2012 zur Verfügung. Die Diagnose, das Geschlecht und das Alter der Patienten sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Die Knochenmarksstanzen wurden zu diagnostischen Zwecken aus dem Beckenkamm (Spina iliaca posterior superior) entnommen. Das Untersuchungsmaterial (Gewebeschnitte von Paraffinblöcken aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des LMU) wurde vor den Analysen im Rahmen dieser Arbeit entsprechend der Vorgaben der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität anonymisiert.

Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand der charakteristischen histomorphologischen Befunde der jeweiligen Erkrankung.

Die Knochenmarksstanzylinder wurden in 5%-igem Formalin fixiert, über Nacht mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entkalkt und anschließend in Paraffin eingebettet. Aus den Blöcken wurden 3-4 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Glasobjektträger aufgezogen.

#### 3.1.2 Kontroll-DNA

Als Positivkontrolle für den Nachweis der *JAK2* V617F Mutation setzten wir ein Gemisch aus humaner genomischer DNA der Zelllinie HEL (DMSZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH) und der Zelllinie SW480 (DMSZ) ein. Die HEL-Zelllinie wurde ursprünglich aus dem peripheren Blut eines 30-jährigen Mannes mit *JAK2* V617F positiver Erythroleukämie (Akute myeloische Leukämie M6) bei Zustand nach Hodgkin Lymphom isoliert. Die SW480-Zelllinie stammt von einem Patienten mit kolorektalem Karzinom und trägt ausschließlich Wild-Typ Allele im Codon 617 des *JAK2* Gens. Für die Positivkontrolle wurde ein Gemisch aus jeweils 10µl HEL-Zellen / SW480 Zellen und 80µl ddH<sub>2</sub>O mit einer DNA-Konzentration von 5 ng/µl hergestellt.

Für die *MPL* W515L Untersuchungen verwendeten wir *MPL* W515L positive DNA (Dr. Schnittger, Labor MLL, München), die auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt und anschließend mit einem 10%igen Anteil Kolon-Karzinom Zellen vermischt wurde.

Als Negativ-Kontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Immunhistochemische Färbungen

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Fragestellung welche hämatopoetischen Zellreihen die *JAK2* V617F Mutation tragen. Mithilfe der Mikrodisektion mittels *Laser Pressure Catapulting* (Sotlar et al., 2010; Schütze et al., 1998) war es möglich, gezielt einzelne Zellen einer hämatopoetischen Linie zu isolieren, hochgradig aufzureinigen und letztendlich für eine molekulare Untersuchung zugänglich zu machen. Für die Identifikation der einzelnen interessierenden hämatopoetischen Linien wurden immunhistochemische Färbungen der Proben angefertigt. Die Immunhistochemie nutzt die spezifische Bindung von Antikörpern an Oberflächenantigene. Durch die Bindung der Antikörper werden die Zellen farblich markiert und sind erst so bei der Lasermikrodisektion zu detektieren. Die benutzten Antikörper (Tab. 8) wurden dabei mit unterschiedlichen Detektionssystemen nachgewiesen (Tab. 9).

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag zudem auf der Fragestellung, ob die lymphatische Zellreihe (CD3-positive Zellen) Träger der *JAK2* V617F Mutation ist. Um eine Kontamination der isolierten T-Zellen durch Zellen der (Neutrophilen) Granulopoese und Zellen des Monozyten-/Makrophagensystems möglichst zu vermeiden, erwies es sich als sinnvoll in diesem Fall eine Doppelmarkierung durchzuführen. Hierbei wurden die zu analysierenden T-Zellen auf der einen Seite (CD3+) und die neutrophilen Granulozyten/Monozyten/Makrophagen (MPO+) auf der anderen Seite mit farblich unterschiedlich konjugierten Sekundäntikörpern markiert.

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Antikörper

Antigen	Klon	Verdünnung	Hersteller (Kat. Nr.)	Angefärbte Zellreihe
Gly C	Ret40f	1 : 100	Dako (M 0820)	Erythroblasten
CD15	80H5	1 : 100	Beckman Coulter (PN Im1921)	Neutrophile Granulozyten
MPO	Polyclonal	1 : 4000	Dako (A 0389)	Neutrophile Granulozyten
EPX	Polyclonal	1 : 100	Santa Cruz (sc-19147)	Eosinophile Granulozyten
2D7	Basophil / 2D7	1 : 250	BioLegend (346202)	Basophile Granulozyten
MCT	AA1	1 : 500	Dako (M 7052)	Mastzellen
CD61	Y2/51	1 : 50	Dako (M 0753)	Megakaryozyten
CD3	Polyclonal	1 : 200	Dako (A 0452)	T-Lymphozyten
CD3	F7.2.38	1 : 80	Dako (M 7254)	T-Lymphozyten

MPO = Myeloperoxidase, Gly C = Glykophorin C, EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Detektionssysteme, Chromogene und Antikörper

Detektionssystem (Hersteller)	Chromogen (Hersteller)	Antikörper
ImmPRESS Reagent Kit Anti-RABBIT Ig (Vector)	AEC + (Dako)	CD3 (polyclonal) MPO
Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Vector)	AEC (Invitrogen)	2D7
MACH 3 Mouse AP Polymer Detection (Biocare)	Chromogen Red (Dako) Vector Blue AP-Substrat Kit III (Vector)	CD61 CD3 (monoclonal)
Streptavidin HRP (Novacastra)	AEC (Invitrogen)	CD15
Biotinylated anti-mouse IgM (Vector)	AEC (Invitrogen)	CD15
ImmPRESS Reagent Kit Anti-GOAT Ig (Vector)	AEC (Invitrogen)	EPX
ImmPRESS Reagent Kit Anti-MOUSE Ig (Vector)	AEC + (Dako) AEC (Invitrogen)	Gly C MCT

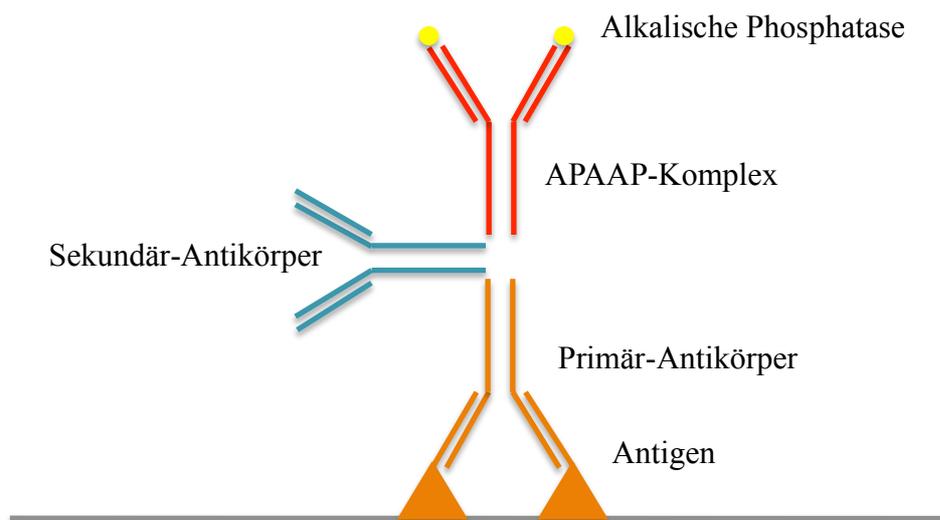
AEC = 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, AP = Alkalische Phosphatase, EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase, Gly C = Glykophorin C

Zur Herstellung der immunhistochemischen Spezialfärbungen wurden im ersten Arbeitsschritt die Gewebeschnitte für 30 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Demaskierung der antigenen Bindungsstellen wurden die Schnitte für 2 x 15 Minuten in der Mikrowelle bei 750 Watt in einer *Target Retrieval Solution* (10 mmol/l Citrat-Puffer pH 6,0 (10x), Dako) gekocht. Eine Spülung in einem TRIS-Puffer pH 7,5 (7,4 mM Trizma® base, Sigma; 43,5 mM Trizma® hydrochlorid, Sigma; 150 mM Natriumchlorid, Merck) erfolgte nach jedem Arbeitsschritt für 2 x 5 Minuten um den pH-Wert auszugleichen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen, erfolgte eine 10-minütige Behandlung mit 7,5% wässriger Wasserstoffperoxidlösung bei Raumtemperatur. Bei Verwendung des *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* (Biocare) und des *Streptavidin HRP Systems* (Novacastra) wurden durch Zugabe eines serumfreien Proteinblocks (0,25% Kasein in Phosphate-Buffered Saline (PBS), Dako) für 20 Minuten unspezifische Antikörperbindungen verhindert. Dagegen wurde sowohl beim *ImmPress Reagent Kit System* (Vector) als auch beim *Vectastain ABC-Kit Elite Universal* (Vector) die im Kit enthaltene Serumblockade verwendet.

Mithilfe der in Tabelle 9 genannten Detektionssysteme wurden im nächsten Arbeitsschritt die Zellen linienspezifisch farblich sichtbar gemacht. Zunächst erfolgte die Zugabe eines unmarkierten Primärantikörpers für 60 Minuten (Verdünnung je nach Antikörper siehe Tabelle 8). Im Anschluss wurde der markierte Sekundärantikörper für 30 Minuten appliziert. Der Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment des Primärantikörpers und fungiert als Brückenantikörper. Beim *ImmPress Reagent Kit System* (Vector) und beim *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* (Biocare) ist der

Sekundärantikörper direkt an Enzymmikropolymeren gebunden. Bei beiden Systemen handelt es sich um biotinfreie Mikropolymer Detektionssysteme. Die Verwendung von Mikropolymeren ermöglicht die Bindung einer großen Anzahl an Enzymmolekülen, wodurch die Signalstärke erhöht und die Sensitivität der Methode gesteigert wird. Das *ImmPress Reagent Kit System* (Vector) wurde zur Färbung von T-Lymphozyten, Erythroblasten, Mastzellen und Eosinophilen Granulozyten genutzt. Bei der Markierung von Megakaryozyten wurde das *MACH 3 Mouse AP Polymer Detection System* (Biocare) verwendet.

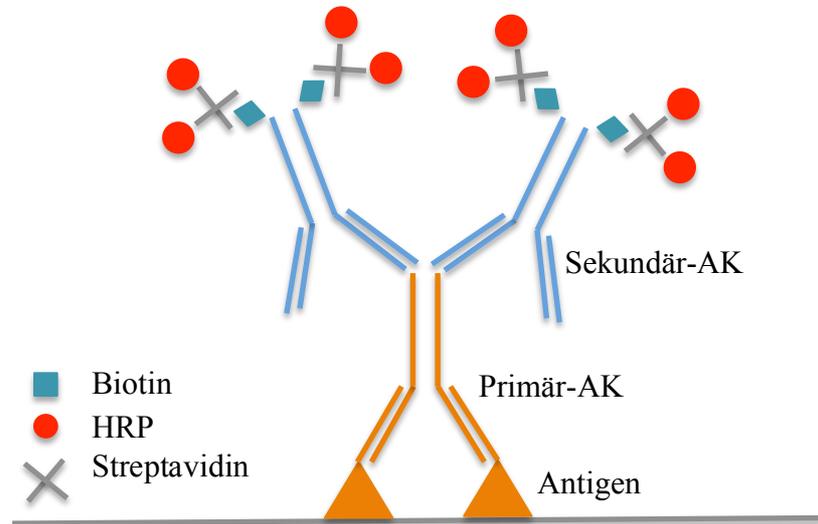
Die Primärantikörper wurden beim *ImmPress Reagent Kit System* und beim *MACH3 Mouse AP Polymer Detection System* durch unterschiedliche chemische Reaktionen visualisiert. Beim *ImmPress Reagent Kit System* wird die verwendete Peroxidase reduziert, wodurch das farblose Chromogen AEC+ zu einer braunroten Farbe oxidiert. Beim *MACH3 Mouse AP Polymer Detection System* kam es nach Zugabe der chromogenen Substanz durch die alkalische Phosphatase zu einer Konversion des Chromogens Red in ein farbliches Produkt (rot).



**Abbildung 4:** *Real Detektion System APAAP*. Der Primärantikörper bindet an das Antigen im Gewebe. Der Sekundärantikörper verbindet den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex. Die alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes reagiert mit dem Chromogen.

Bei der Färbung von CD15+ (neutrophile Granulozyten, Monozyten) und 2D7+ (basophile Granulozyten) Zellen wurde die (*Labelled-Strept*)-Avidin-Biotin-Methode angewendet. Hierbei handelt es sich um eine dreistufige Methode, bei der die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin zu dem Vitamin Biotin genutzt wird. Avidin und Streptavidin besitzen beide jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Durch die Konjugation des Sekundärantikörpers mit Biotin ist es möglich eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex herzustellen. Zunächst wurde analog zu den beiden anderen Systemen die Probe für 60 Minuten mit dem

Primärantikörper *Antibody Diluent* (Dako) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Als Detektionssystem wurde eine an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase verwendet. Der Peroxidase wurde Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten. Die hierbei freigesetzten Protonen oxidierten das fast farblose Chromogen AEC+ innerhalb von 10 Minuten zu einem braunroten Endprodukt.



**Abbildung 5:** *Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode.* Der Primärantikörper bindet an das Antigen im Gewebe. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper sowie an die an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase.

Für die Doppelmarkierung CD3/MPO wurden zunächst die gleichen Arbeitsschritte wie bei den Einzelfärbungen durchgeführt. Anschließend wurde der Primärantikörper MPO mithilfe des *ImmPress Reagent Kit System* (Vector) sichtbar gemacht. Danach erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers CD3. Der Sekundärantikörper wurde mittels *MACH3 Mouse AP Polymer Detection System* (Biocare) visualisiert. Als Chromogen wurde in diesem Fall das *Vector Blue AP-Substrat Kit III* (Vector) verwendet.

Abschließend erfolgte bei allen Färbesystemen eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun (*Hematoxylin Gill's Formula*, Vector) für 10 Sekunden. Auf das Eindecken des Schnittes mit einem Deckglas wurde aufgrund der weiteren Untersuchungen mittels Mikrodisektion verzichtet.

### 3.2.2 *JAK2*-Mutationsanalysen an Gesamt-DNA

Zur Identifikation geeigneter Studienpatienten mit *JAK2* V617F Mutation erfolgte zunächst eine Untersuchung der Gesamt-DNA. Für die Mutationsanalysen der Proben wurden nach Amplifikation der Hot-Spot-Region im Codon 617 des *JAK2*-Gens zwei unterschiedliche Verfahren verwendet:

- Schmelzpunktanalyse
- Pyrosequenzierung

#### 3.2.2.1 DNA-Extraktion

Für die Extraktion der Gesamt-DNA wurden je nach Größe der Knochenmarksstanze 4 bis 6 Schnitte benötigt. Die Schnitte wurden für 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und zur Entfernung der Xylolreste für 2 x 10 Minuten in absolutem Ethanol inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte für 20 Minuten an der Luft getrocknet.

Die nächsten Extraktionsschritte wurden mit einem Kit der Firma Qiagen (QIAamp® DNA Micro Kit) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Pro Schnitt wurden jeweils 180µl ATL-Buffer (Qiagen) mit 20µl Proteinase K versetzt und in ein sauberes 2 ml Auffanggefäß gefüllt. Anschließend wurden von allen Objektträgern eines Patienten die Gewebeproben mit einem sterilen Skalpell abgekratzt und in das Auffanggefäß gegeben. Der Puffer inklusive der Probe wurde über Nacht bei 56°C in einem Thermomixer durch die Proteinase verdaut. Der Thermomixer ermöglicht eine optimale Durchmischung von Gewebe und Proteinase. Die Reinigung der DNA erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Abschließend wurde die DNA in 12 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt.

#### 3.2.2.2 DNA-Amplifikation

Bei einer PCR handelt es sich um ein Verfahren mittels dessen ein DNA-Template in vitro exponentiell vervielfältigt werden kann. Alle PCRs wurden im Rahmen dieser Studie im selben automatisierten Thermocycler (Veriti 96 Well Thermocycler, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die spätere Untersuchung mittels Schmelzpunktanalyse bestand die PCR aus 55 Zyklen, die sich wie üblich aus einer *Denaturierungsphase*, einer *Annealingphase* und einer *Elongationsphase* zusammensetzten.

Zweck der *Denaturierungsphase* ist es die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären DNA-Strängen zu lösen um einzelsträngige DNA-Templates zu erhalten. Zur Denaturierung der DNA-Stränge wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf 95°C angehoben. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde für 45 Sekunden eine Aktivierungsphase bei 95°C durchgeführt. In dieser Aktivierungsphase / Initialisierungsphase wird die *hot-start* Polymerase durch eine Konformationsänderung in ihre aktive

Form überführt. Diese Aktivierung verhindert eine unspezifische Bindung der Polymerase schon bei niedrigen Temperaturen an die DNA. Zudem wird sichergestellt, dass zum einen alle doppelsträngigen DNA-Templates vollständig denaturieren und zum anderen keine unspezifischen Primerbindungen stattfinden.

Die *Annealingphase* bzw. Hybridisierungsphase dient der Bindung der im Reaktionsgemisch enthaltenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngigen DNA-Templates. Hierzu wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf 56°C gesenkt. Die beiden verwendeten Primer (siehe Tabelle 10) wurden so gewählt, dass sie den zu analysierenden DNA-Abschnitt einschließen, ähnliche Hybridisierungstemperaturen besaßen und ein möglichst kurzes spezifisches Amplikon generierten.

Für die Elongationsphase wurde die Probe anschließend für 30 Sekunden auf 72°C erhitzt. Bei 72°C bindet die thermostabile Polymerase optimal an die Primer und kann die gewünschte Sequenz unter Anbau von dNTPs verlängern. Die neu synthetisierte doppelsträngige DNA entspricht dem zu analysierenden DNA-Template. Da die Komplementierung an beiden DNA-Strängen gleichzeitig abläuft, verdoppelt sich die DNA-Menge nach jedem Zyklus. Dem letzten Zyklus wurde eine verlängerte *Elongationsphase* von fünf Minuten bei 72°C angeschlossen. Diese Phase stellt sicher, dass die Elongation möglichst für viele Kopien komplettiert wird. Schließlich wurde die Probe auf 10°C abgekühlt.

**Tabelle 10:** Übersicht der verwendeten Primer

Primer	Sequenz	Länge	T <sub>m</sub> (°C)
JAK2 2F	5'- AGC AGC AAG TAT GAT GAG C-3'	19 nt	50,3
JAK2 2B	5'- AGC TGT GAT CCT GAA ACT GAA TTT TCT -3'	27 nt	59,9
D0370 JAK2-F1-Bio	5'- TTC TCA CAA GCA TTT GGT TTT AA-3'	23 nt	51,0
D0371 JAK2-R1	5'- GAT GCT CTG AGA AAG GCA TTA GAA-3'	24 nt	54,0
D0372 JAK2-S1	5'- TTA CTT ACT CTC GTC TCC AC - 3'	20 nt	41,0

T<sub>m</sub> = Schmelzpunkttemperatur

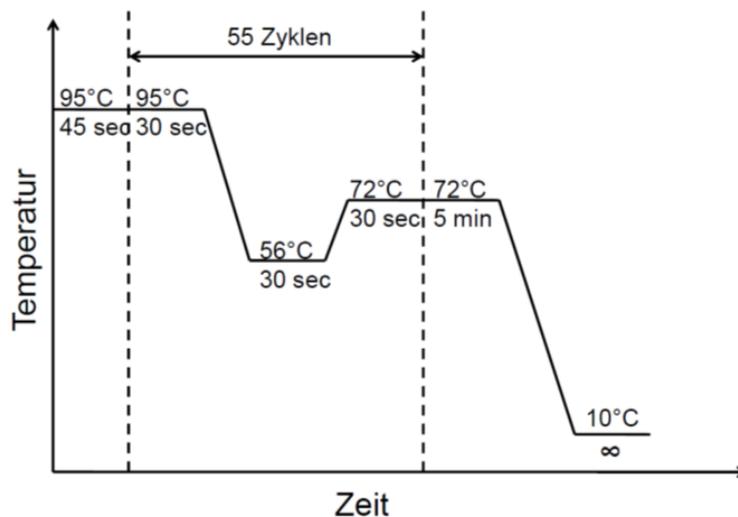
PCR-Ansatz für die Schmelzpunktanalyse:

- 3,75 µl 10 x Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15mM MgCl, 0,01 % (w/v) Gelatine, Applied Biosystems)
- 0,3 µl dNTPs (25 µM, Fermentas)
- Je 1,5 µl Primer JAK2 2F (5µM, Tibmolbiol) und Primer JAK2 2B (5µM, Tibmolbiol)
- 0,15 µl Taq Polymerase (5U/µl, Applied Biosystems)
- 4,5 µl DNA (25ng/µl) oder JaCo-DNA (5ng/µl, Positivkontrolle) oder ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)

mit ddH<sub>2</sub>O auf 37,5 µl auffüllen.

Ansatz Mastermix JAK2 2F/2B für 227µl :

- 170 µl H<sub>2</sub>O (Braun)
- 25 µl 10 x Buffer (AmpliTaq-Set, Appl. Biosys.)
- 2 µl dNTPs (25mM each, Fermentas)
- je 15 µl JAK2 2F und 2B (vorverdünnt 15 µl 100µM + 285 µl H<sub>2</sub>O, Tibmolbiol)



**Abbildung 6:** Ablauf der PCR für die späteren Analysen mittels *Lightcycler*. 45 Sekunden Initialisierungsphase bei 95°C, 55 Amplifikationszyklen bestehend aus 30 Sekunden Denaturierungsphase bei 95°C, 30 Sekunden Hybridisierungsphase bei 56°C, 30 Sekunden Elongationsphase bei 72°C, 5 Minuten Elongationsphase bei 72°C, Abkühlung der Proben auf 10°C

### 3.2.2.3 Schmelzpunktanalyse mit Hybridisierungssonden

Bei der Schmelzpunktanalyse handelt es sich um ein Verfahren zur Detektion von Mutationen basierend auf dem *Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer* (FRET).

Beim FRET werden zwei benachbarte fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden verwendet die komplementär zu einer Sequenz innerhalb des Amplikons sind. Die erste Sonde, die sogenannte Detektionssonde, ist an ihrem 3'-Ende mit dem F1 Donor-Fluorophor Fluoreszein markiert und enthält die komplementäre Sequenz für die *JAK2* V617F Mutation. Die zweite Sonde, die Ankersonde, ist an ihrem 5'-Ende mit dem F2 Akzeptor-Fluorophor LC-Red640 gekoppelt und besitzt eine höhere Schmelzpunkttemperatur als die Detektionssonde. Die Ankersonde bindet in enger Nachbarschaft zur Detektionssonde an eine nicht polymorphe Region.

Zu Beginn der Untersuchung erfolgte die Denaturierung der DNA-Templates durch Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 95°C. Im nächsten Schritt wurden die Proben auf 40°C abgekühlt. Dies ermöglicht es den Sonden an ihre komplementären Sequenzen zu binden. Hybridisieren beide Sonden in enger Nachbarschaft zueinander emittiert das durch eine Lichtquelle im *LigthCycler*® angeregte F1 Donor-Fluorophor Licht. Das F2 Akzeptor-Fluorophor absorbiert das Licht und gibt die Energie in Form von Licht einer größeren Wellenlänge wieder ab ( $\lambda = 470\text{nm}$ ). Das emittierte Licht wird

kontinuierlich durch spezifische Photohybrid-Detektoren im LigthCycler® gemessen. Die Stärke des registrierten Signals ist proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes (Nauck, Gierens et al. 2001).

Während der eigentlichen Analyse wurde die Temperatur langsam bis auf eine Endtemperatur von 95°C erwärmt ( $\Delta T = 0,3^\circ\text{C}$  pro Sekunde). Ab einer bestimmten Temperatur kommt es zu einer Dissoziation der Detektionssonde von der Zielsequenz, sodass die für das FRET-Signal erforderliche Nähe zur Anchorsonde nicht mehr gegeben ist und es zu einem abrupten Abfall des Fluoreszenzsignals kommt. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Detektionssonden in einem dissoziierten Zustand vorliegt, wird als Schmelztemperatur ( $T_m$ ) bezeichnet. Je nachdem ob die Detektionssonde voll komplementär zur Zielsequenz ist oder ob ein *mismatch* zwischen Sonde und Amplikon besteht liegen unterschiedliche  $T_m$  der Detektionssonden vor.

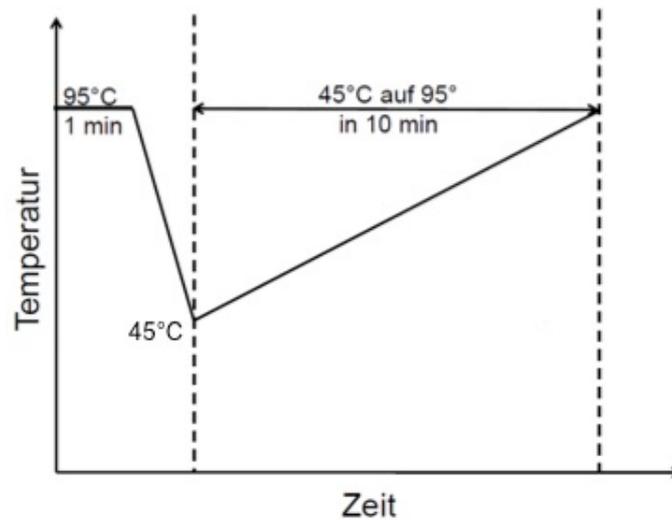
**Tabelle 11:** Übersicht der verwendeten Hybridisierungssonden *JAK2* V617F

Sonde	Sequenz	Länge	$T_m$ (°C)
Kai-Sensor <sub>1</sub>	5'-TGT CTC CAC AGA AAC ATA CTC CAT AA-3'(FL)*	26	56,2
Kai-Anchor	5'-LC640-TAA AAC CAA ATG CTT GTG AGA AAG CTT GCT T-3'-PH	31	66,6

**I:** Mutation G → T für V617 F an Position 1849;  $T_m$  = Schmelzpunkttemperatur

Ansatz für die Schmelzpunktanalyse:

- 0,54  $\mu\text{l}$  Kai-Sensor (6 $\mu\text{M}$ , Tibmolbiol)
- 0,54  $\mu\text{l}$  Kai-Anchor (6 $\mu\text{M}$ , Tibmolbiol)
- 0,91  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Quiagen)
- 4,01  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, PCR-Grade
- 6  $\mu\text{l}$  DNA-Template

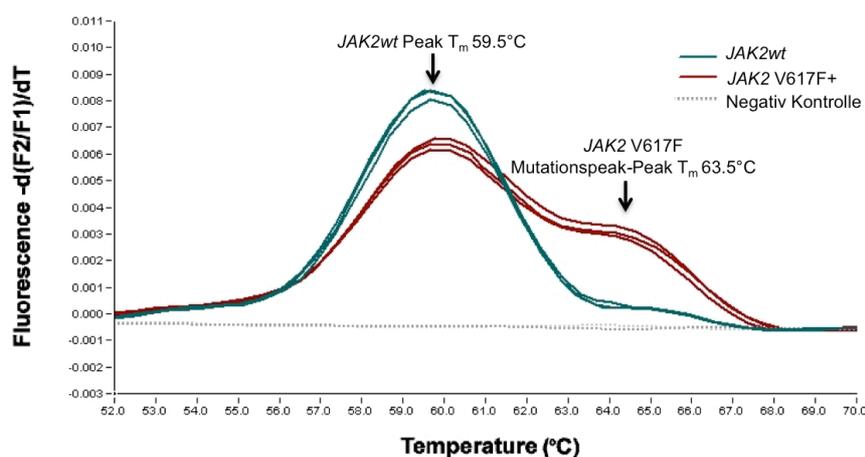


**Abbildung 7:** Ablauf der Schmelzpunktanalyse am Light-Cycler®. Denaturierungsphase 1 Minute bei 95°C, 95°C in Temperaturerhöhung von 45°C auf 10 Minuten

### 3.2.2.4 Auswertung der Schmelzkurven

Zur Auswertung der Ergebnisse errechnet die LighCycler®-Software eine Ableitung der Lichtemission über einen Temperaturverlauf  $((F2/F1)/\Delta T)$ . Die Ableitung zeigt die Wendepunkte der Schmelzkurven als gut abgrenzbare Maxima. Ist ein Patient homozygoter Träger der *JAK2* V617F Mutation, liegt die  $T_m$  bei ca. 63.5°C. Im Falle einer Wildtypsequenz liegt  $T_m$  um 4°C niedriger bei 59.5°C. Liegt eine heterozygote Mutation vor, sind entsprechend zwei Maxima sichtbar.

Die Gesamt-DNA einer Patientenprobe wurde als mutiert gewertet, wenn sich ein signifikantes Signal in der Schmelzpunktanalyse zeigte. Waren die Ergebnisse innerhalb der drei von jeder Probe angesetzten Amplifikate unterschiedlich bzw. nicht eindeutig wurde die Untersuchung wiederholt.



**Abbildung 8:** Darstellung der Schmelzpunktanalyse eines im *JAK2* V617F mutierten (rote Linien) und *JAK2 wt* Patienten (grüne Linien). Die Sensorsonde besitzt die Basensequenz der *JAK2* V617F Mutation und eine Schmelzpunkttemperatur von ca.  $T_m = 63.5^\circ\text{C}$ . Die *JAK2 wt* Sequenz besitzt aufgrund des *mismatches* der Sonde eine um 4°C niedrigere Schmelzpunkttemperatur (ca.  $T_m = 59.5^\circ\text{C}$ )

### 3.2.2.5 Pyrosequenzierung

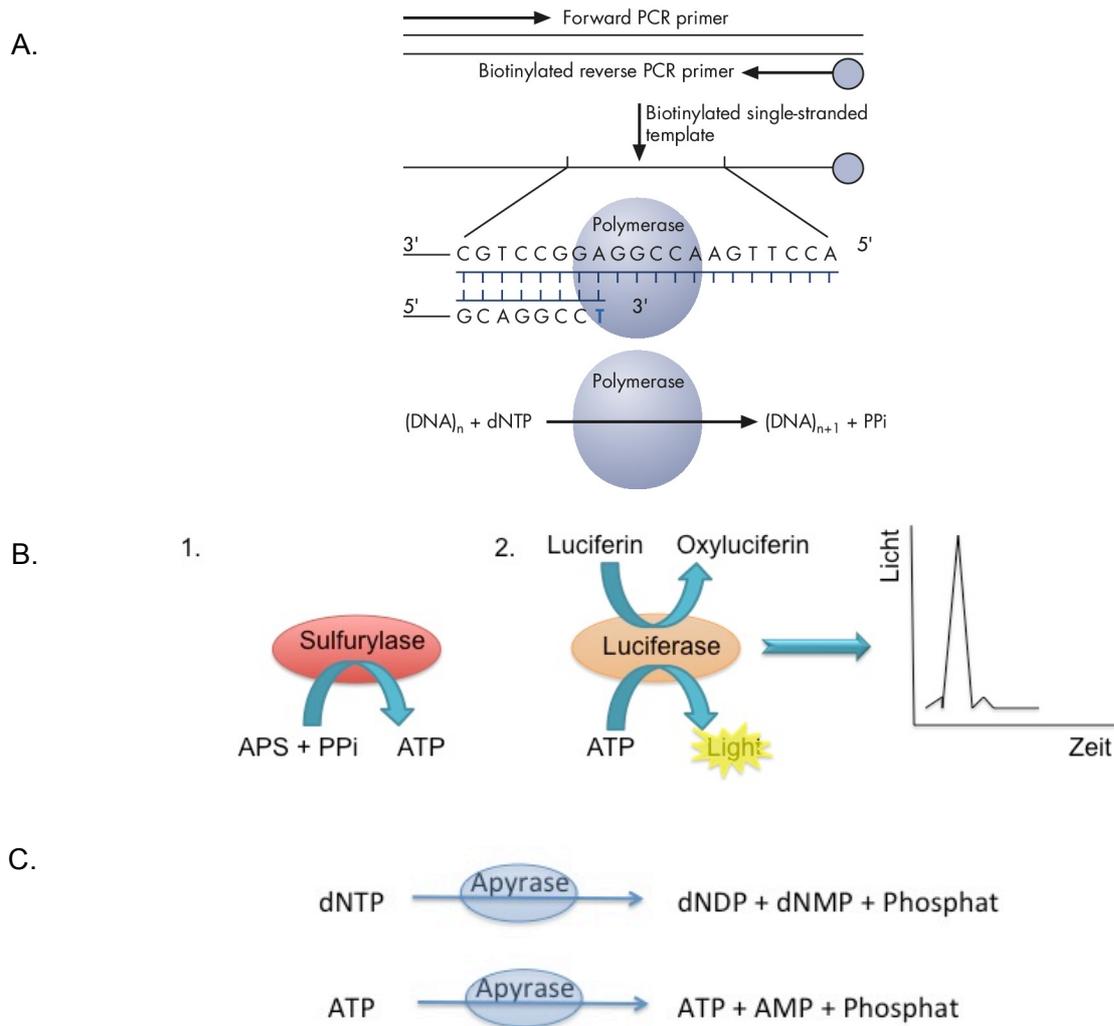
Alle Pyrosequenzierungen wurden am PyroMark Q24 Sequenzierautomaten (Biotage/Quiagen) durchgeführt.

#### 3.2.2.5.1 Prinzipien der Pyrosequenzierung

Bei der Pyrosequenzierung handelt es sich um eine Methode, mit der es möglich ist Mutationen innerhalb einer bekannten Sequenz nachzuweisen und einen Überblick über die Frequenz der mutierten Allele zu bekommen. Die Sequenzierung erfolgt, ähnlich wie bei anderen Sequenzierverfahren, parallel zur Neusynthese des DNA-Stranges. Das Verfahren basiert auf messbaren Lichtsignalen, die durch enzymatische Aktivität freigesetzt werden sobald dNTPs durch die Polymerase zur Strangelongation eingebaut werden.

Dem Reaktionsgemisch bestehend aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase, Adenosin 5' Phosphosulfat (APS), Luziferin, Primern und einzelsträngiger DNA werden im ersten Schritt die einzelnen dNTPs nacheinander in wiederkehrender Reihenfolge zugegeben. Verlängert die Polymerase unter Einbau eines komplementären dNTPs den Sequenzierstrang, kommt es zur Abspaltung von Pyrophosphat. Dieses wird anschließend in Anwesenheit von Adenosin 5' Phosphosulfat von der Sulfurylase zu ATP umgesetzt. Das neu entstandene ATP wiederum wird von einer Luziferase genutzt um Luziferin in Oxyluciferin zu konvertieren. Bei der Konversion zu Oxyluciferin wird ein Lichtsignal emittiert, das durch eine CCD-Kamera (Charge coupled device-Camera) registriert, quantifiziert und mithilfe einer Software als Peak im Pyrogramm graphisch dargestellt wird. Die Höhe des Peaks, d.h. die Stärke des Signals, ist weitgehend proportional zur Menge der eingebauten Nukleotide.

Da es sich bei dATP um ein potentielles Substrat der Sulfurylase handelt und es somit zu falsch-positiven Ergebnissen kommen könnte, wird anstelle von dATP Desoxyadenosin- $\alpha$ -Thiotriphosphat (dATP $\alpha$ S) verwendet. Zudem werden unspezifische Lichtreaktionen vermieden indem die Apyrase kontinuierlich nicht eingebaute Nukleotide sowie überschüssiges ATP degradiert. Sobald die Degradierung abgeschlossen ist beginnt der Reaktionsablauf von neuem.



**Abbildung 9:** Prinzipien der Pyrosequenzierung (Qiagen, [www.qiagen.com/de/shop/automated-solutions/pyromark-q24/#technicalspecification](http://www.qiagen.com/de/shop/automated-solutions/pyromark-q24/#technicalspecification)). A. Im ersten Schritt wird ein DNA Segment amplifiziert. Der Einzelstrang der als *Pyrosequencing-template* dient wird biotinyliert. Nach der Denaturierung wird das biotinylierte einzelsträngige PCR-Amplikon für die Hybridisierung der Sequenzierungsprimer isoliert. Anschließend werden die an das einzelsträngige PCR-Amplikon hybridisierten Primer mit Enzymen (DNA Polymerase, ATP Sulfurylase, Luciferase, Apyrase) und Substraten (Adenosin 5'Phosphosulfat, Luciferin) inkubiert. Jeder Einbau eines dNTPs führt zur Freisetzung von Pyrophosphat. Die PPi-Menge entspricht der Menge an eingebauten Nukleotiden. B. Der Einbau eines Nukleotids führt zur Lichtemission welche als Peak im Pyrogramm dargestellt wird. C. Die Apyrase ist ein Nukleotid-degradierendes Enzym, welches kontinuierlich nicht eingebaute Nukleotide und ATP abbaut.

### 3.2.2.5.2 Besonderheiten der PCR für die Pyrosequenzierung

Zunächst wurde die DNA mittels PCR unter den in Kapitel 3.2.2.2. beschriebenen Bedingungen amplifiziert.

Dabei wurde ein spezieller biotinylierter *forward* Primer verwendet. Durch den biotinylierten Primer wurde der neu synthetisierte DNA-Strang mit einem Biotin-Rest markiert, welcher später an Sepharose-Beads binden konnte.

Das PCR-Verfahren lief in 50 Zyklen ab. Die 50 Zyklen setzten sich aus jeweils 30 Sekunden *Denaturierungsphase* bei 95°C, 30 Sekunden *Annealingphase* bei 60°C und 30 Sekunden *Elongationsphase* bei 72°C zusammen. Dem ersten Zyklus wurde eine 15 minütige Aktivierungsphase bei 95° vorangestellt. Zur Komplettierung möglichst vieler Kopien wurde nach dem letzten Zyklus eine verlängerte Elongationsphase von 2 Minuten bei 72°C angeschlossen.

PCR-Ansatz:

- 4µl 10 x Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15mM MgCl, 0,01 % (w/v) Gelantine, Applied Biosystems)
- 0,4µl dNTPs (25 µM, Fermentas)
- 0,2µl Taq-Polymerase (5U/µl, Applied Biosystems)
- 0,8µl Primer-Mix D370 *JAK2-F1-Bio* /D371 R1 c = 20 µM
- 32,6µl H<sub>2</sub>O, PCR-Grade
- 2µl DNA (25ng/µl) oder JaCo-DNA (5ng/µl, Positivkontrolle) oder ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)

### 3.2.2.5.3 Vorbehandlung der PCR-Produkte für die Pyrosequenzierungen

Ziel der Vorbehandlung ist es, die für die Sequenzierung notwendigen einzelsträngigen DNA-Templates (ssDNA) herzustellen und zu reinigen. Bei der Sequenzierung dient die einzelsträngige DNA der DNA-Polymerase als Matrix.

Als Erstes erfolgte die Herstellung eines *Primermix* und eines *Beads-Mastermix*:

a) Ansatz *Primermix*:

- 2,5µl D0372 *JAK2-S1*, 0,3µM (Biomers)
- 22,5 µl PyroMark annealing buffer (Qiagen)

Jeweils 25 µl des Primer Mix wurden in den entsprechenden Napf der Flachbodenplatte vorgelegt und diese auf der *Pyro Vacu Prep Station* platziert.

b) Ansatz *Beads-Mastermix*:

- 2µl Streptavidin Sepharose<sup>TM</sup> Beads
- 40 µl PyroMark binding buffer (Qiagen)
- 23 µl ddH<sub>2</sub>O (Kerndl)

65 µl des *Beads-Mastermix* und 15 µl des PCR-Produkts wurden in eine Sitzbodenplatte pipettiert und anschließend für 5 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation konnten die Sepharose-Beads an die mit Biotin markierten DNA-Stränge binden.

Als Nächstes wurden die an Streptavidin-Sepharose gebundenen Amplifikate vom *Vacuum Prep Tool* aufgenommen und die überschüssige Flüssigkeit aufgesaugt. Die Sepharose-Beads bleiben mit der gebundenen DNA am Filter des Tools hängen.

Darauffolgend wurde die Waschstation nach Anleitung des Herstellers durchlaufen. Die Waschstation setzt sich aus verschiedenen Wasch- und Denaturierungsschritten (70% Ethanol, ddH<sub>2</sub>O, Binding Buffer (Quiagen, Pyromark), 10 x Washbuffer (Quiagen Pyromark)) zusammen. Beim Durchlaufen der Waschstation wird die DNA gereinigt, denaturiert und abschließend erneut gewaschen.

Im Anschluss wurde das Tool dicht über die Flachbodenplatte abgesenkt, das Vakuum abgestellt und das Tool dann auf die Flachbodenplatte abgesetzt. Damit die ssDNA in den Primermix fällt. Durch leichtes Rütteln am Tool kann das Abfallen begünstigt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Well-Platte für 2 Minuten bei 80°C auf einer Heizplatte inkubiert. Hierbei kommt es zu einer erneuten Denaturierung der DNA. Danach wurde die Wellplatte 5 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Das Abkühlen ermöglicht es den Sequenzierungsprimern an ihre komplementäre Sequenz zu hybridisieren. Anschließend wurde die Wellplatte in die dafür vorgesehene Vorrichtung des PyroMark Q24 Sequenzierautomaten (Biotage/Quiagen) platziert.

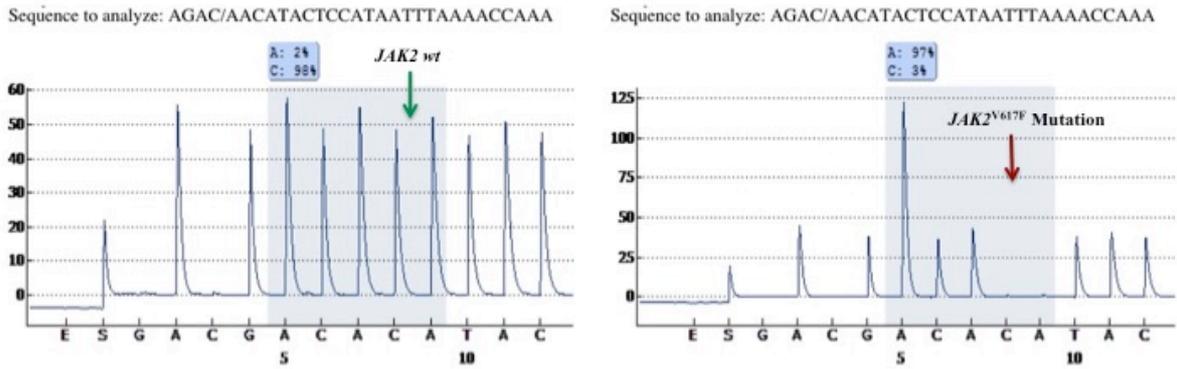
Die PyroMark Q24 Cartridge (Quiagen) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit den PyroMark Gold Q24 Reagenzien (Quiagen) befüllt und ebenfalls in die zugehörige Vorrichtung gesetzt.

Daraufhin wurde die Sequenzierungsreaktion gestartet.

#### **3.2.2.5.4 Auswertung des Pyrogramms**

Das Pyrogramm ist eine graphische Darstellung der Frequenz einzelner Nukleotide in einer untersuchten Gensequenz. Im Falle einer *JAK2* V617F Mutation wird die Base Guanin durch Thymin im Codon 617 ersetzt (G→T). Das Pyrogramm gibt eine Ratio zwischen eingebauten *wt* (G) und mutierten Allelen (T) an (Hussein, Bock et al. 2007)

Durch Bestimmung der unterschiedlichen Peakhöhen und den Vergleich mit der *wt*-Sequenz kann auf das Vorliegen der Mutation geschlossen werden. Als Nachweisgrenze für die *JAK2* V617F Mutation legten wir eine Mutationslast von mindestens 20% fest. Analog zur Schmelzpunktanalyse wurde die Pyrosequenzierung bei unklaren Ergebnissen wiederholt.



**Abbildung 10:** Darstellung der Pyrosequenzierungen eines *JAK2 wt* und *JAK2 V617F* mutierten Patienten.

### 3.2.3 *JAK2 V617F*-Mutationsanalysen an mikrodissektierten Zellen

Zur Untersuchung der hämatopoetischen Zellreihen wurde in dieser Arbeit die Methode des *Laser Pressure Catapulting* verwendet. Basierend auf einem fokussierten Laserstrahl ( $\lambda = 337\text{nm}$ ) (Axiovert 200M, Palm System, Zeiss, Software: Palm®Robo Software, Micro Laser Systems, Version 2.2-0103 (DE)), können Zellen auf einige Mikrometer genau isoliert werden. Der Laserimpuls erfasst die markierten Zellen innerhalb einer Nanosekunde, sodass es zu keiner relevanten Schädigung des umliegenden Gewebes kommt und außerdem eine Kontamination der Probe weitestgehend vermieden wird (Schütze et al., 1998).

#### 3.2.3.1 Lasermikrodissektion von Einzelzellen

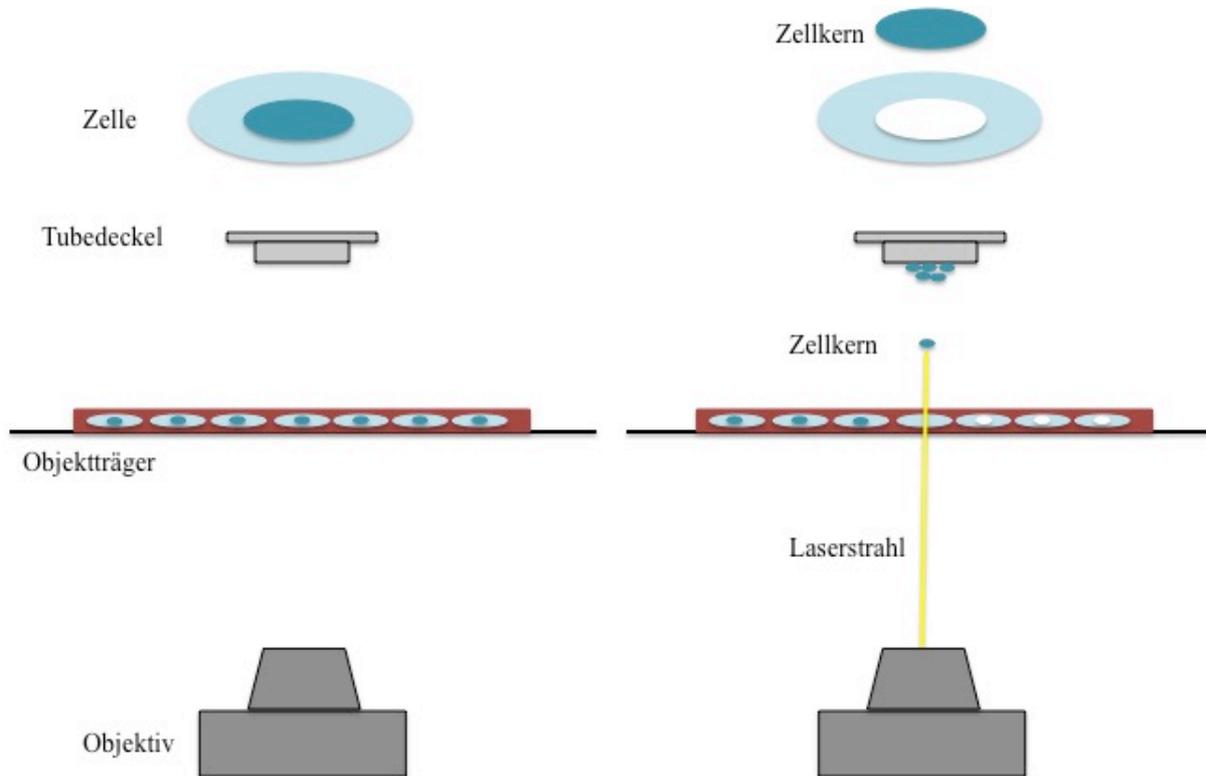
Bei der Lasermikrodissektion wird mittels einer integrierten Kamera das im Mikroskop zu sehende Bild in Echtzeit auf einen Computer-Bildschirm übertragen. Auf diesem Live-Bild können mithilfe einer Software die zu katapultierenden Zellen per Mausklick markiert werden. Ein Laserimpuls wird an der Stelle der Markierung gesetzt, sodass die markierten Zellen nacheinander in ein Auffanggefäß katapultiert werden. Zur Schonung des umliegenden Gewebes wird der Brennpunkt des Laserstrahls knapp unterhalb des Gewebes eingestellt. Durch eine inverse Optik trifft der Laserstrahl von unten auf das Gewebe und befördert die Zelle nach oben in das Auffanggefäß. Die katapultierten Zellen bleiben in dem mit Öl beschichteten Tube-Deckel hängen.

Als Auffanggefäß wurde der Deckel eines 0,2 ml PCR-Tubes mit Mineralöl (Sigma) dünn benetzt und dieser vom restlichen Gefäß abgetrennt. Der Deckel wurde anschließend in eine spezielle Vorrichtung über dem Objektträger positioniert. Die Distanz zum Objektträger wurde möglichst gering gewählt damit die Zellen optimal in das Auffanggefäß katapultiert werden können.

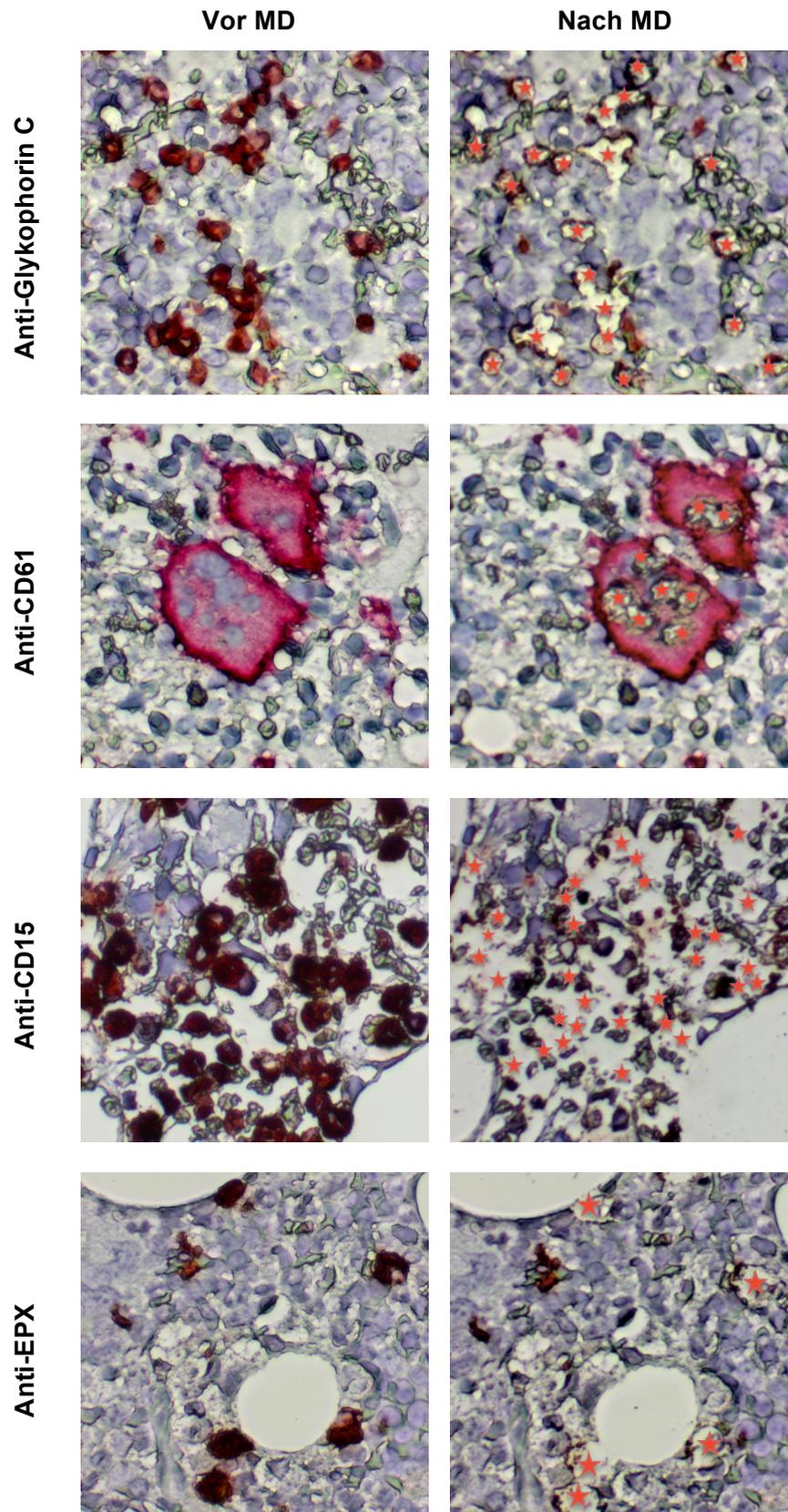
Für die späteren genetischen Untersuchungen hat es sich als sinnvoll erwiesen 1000 Zellen einer Zellreihe zu „poolen“, da das verwendete Material durch Formalinfixierung und EDTA-Entkalkung

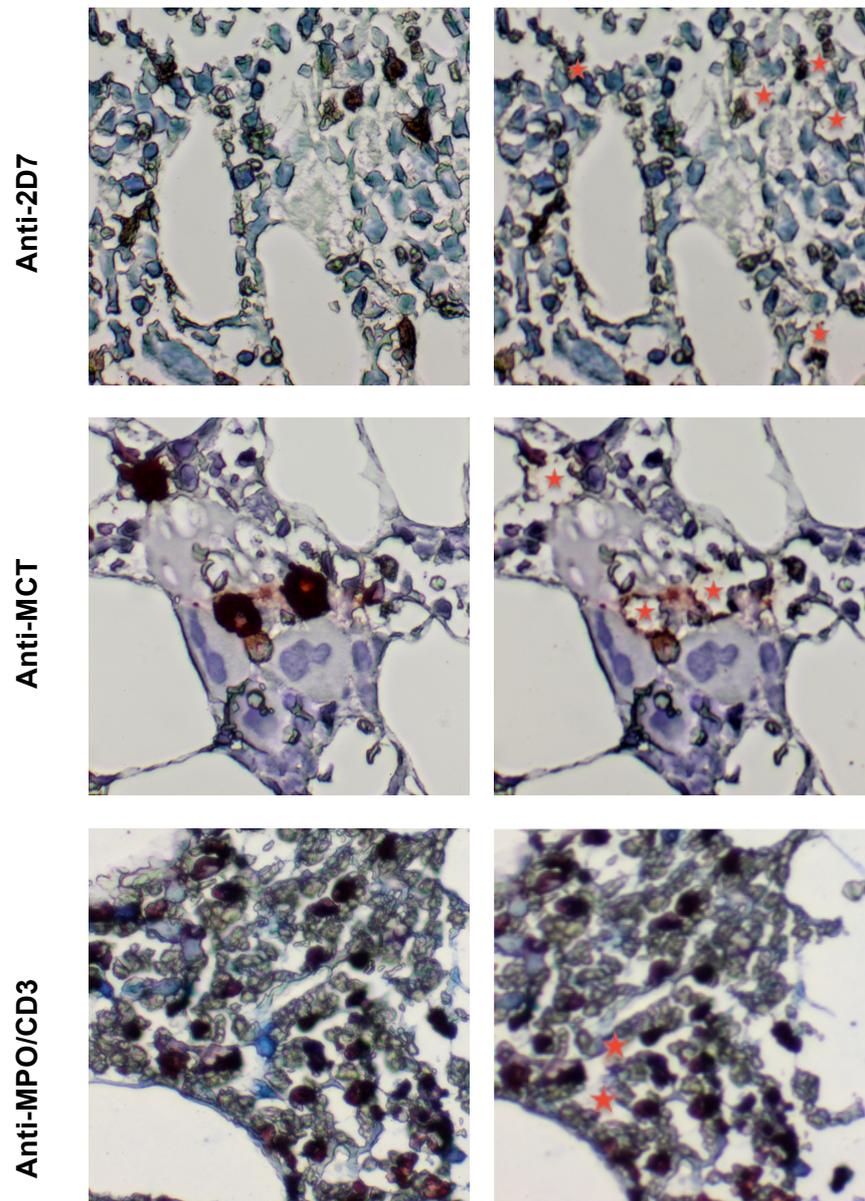
mehrfach vorbehandelt ist und die DNA teilweise degradiert ist. Um die Mutationsanalyse vergleichend mittels zwei Methoden durchzuführen, wurden von jeder Zellreihe eines Falls 2 Tubes à 1000 Zellen katapultiert. Nach der Aufbereitung der Proben wurden die Volumina der zwei Tubes zusammen pipettiert.

Anschließend wurde der Deckel zurück auf das zugehörige PCR-Tube gesetzt und das Tube verschlossen. Nach der Isolierung von jeweils einer Zellreihe wurde eine Negativ-Kontrolle, d.h. ein Reaktionsgefäß ohne Zellen zur Kontrolle analysiert.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Palm *Micro-Beam-Systems*





**Abbildung 12:** Mikrodissektion von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark. Auf der linken Seite ist der Zustand vor der Mikrodissektion (MD), auf der rechten Seite der Zustand nach der Mikrodissektion abgebildet. ★ = mikrodisssektierte Zellen, EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase, MPO = Myeloperoxidase

### 3.2.3.2 Aufbereitung der mikrodisssektierten Zellen

Um genetische Untersuchungen an mikrodisssektierten Zellen durchführen zu können, erfolgte zunächst ein Verdau der Zellen mittels Proteinase K. Dieser Verdau bewirkt eine Lyse der Zellproteine und insbesondere die Trennung der DNA von Histonproteinen. Ziel der Aufbereitung ist es den zu analysierenden DNA-Abschnitt für die weitere Amplifikation der DNA-Polymerase zugänglich zu machen.

Für den Verdau der Zellen wurden 9 µl aus einem Gemisch von 398 µl TE-Puffer (50 mM Tris, 1 mM

EDTA, pH 8,4) mit 2 µl 0,5% Tween 20 (Merck) entnommen und in den Tubedeckel pipettiert. Die Tubes wurden wieder verschlossen und mit dem Deckel nach unten auf einer Heizplatte bei 97°C für 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit aus dem Deckel der Reaktionsgefäße bei 16000 G abzentrifugiert.

Danach wurden den Proben 5 µl Proteinase K (> 318 mAU/ml, Quiagen) hinzugefügt und in einem Thermocycler für 12 Stunden bei 55°C verdaut. Anschließend wurde die Proteinase K 5 Minuten bei 95°C inaktiviert.

### **3.2.3.3 Amplifikation der DNA aus mikrodisektierten Zellen**

Um die aus den mikrodisektierten Zellen extrahierte DNA auf die *JAK2* V617F Mutation hin untersuchen zu können, erfolgte zunächst die Amplifikation der DNA. Wie in Kap. 3.2.3.1 beschrieben, wurden zwei Tubes à 1000 Zellen einer gleichen Zellreihe einer Patientenprobe vermischt. Dem Gesamtvolumen von 28 µl wurde dann das für die jeweilige PCR erforderliche Volumen entnommen.

Als Erstes erfolgte die PCR für die Schmelzpunktanalyse analog zu der in Kap. 3.2.2.2 beschriebenen PCR. Von jedem Sample wurde ein Triplet plus Leerwert analysiert.

Für die Pyrosequenzierung wurde die Amplifikation nach dem in Kap. 3.2.2.4.2 beschriebenen Schema durchgeführt. Auch hier wurden jeweils drei Ansätze einer Probe untersucht.

### **3.2.3.4 Auswertung der Ergebnisse**

Eine hämatopoetische Zelllinie wurde als mutiert angesehen, wenn die Mutation reproduzierbar darstellbar war, d.h. es mussten mindestens zwei der drei Ansätze einen signifikanten Mutationspeak in der Schmelzpunktanalyse oder ein mutationsspezifisches Pyrogramm zeigen. Im Falle eines nicht eindeutigen Ergebnisses (z.B. nur ein mutationsspezifisches Ergebnis) wurde die Untersuchung erneut durchgeführt. Eine Zellreihe bzw. deren DNA galt als nicht amplifizierbar wenn sich auch nach wiederholter Mikrodisektion weder ein Peak in der Schmelzpunktanalyse noch ein Signal in der Pyrosequenzierung zeigte.

### **3.2.3.5 Verdünnungsreihe zur Ermittlung der analytischen Sensitivität**

Um die Nachweisgrenze *JAK2* V617F positiver mikrodisektierter Zellen zu ermitteln, führten wir eine Verdünnungsreihe durch. Dazu wurden zwei geeignete Fälle aus dem Kollektiv dieser Studie ausgewählt. Das Patientenmaterial des ersten Falles zeigte in der Gesamt-DNA ein sehr starkes Mutationssignal mit fehlendem *JAK2* wt-Signal, was auf eine homozygote *JAK2* V617F schließen lässt. Beim zweiten Patienten war in beiden Analyseverfahren ausschließlich die *JAK2* wt-Sequenz nachweisbar.

Aus diesen beiden Fällen wurden Zellen in dem in Tabelle 12 angegebenen Schema mikrodisssektiert. Anschließend wurde die DNA in Triplets amplifiziert und die Proben mittels Schmelzpunktanalysen genotypisiert.

**Tabelle 12:** Mikrodisssektions-Schema der Verdünnungsreihe

Tube-Nr.	<i>JAK2</i> Codon 617 wt	<i>JAK2</i> V617F +
1	1000	0
2	0	1000
3	500	500
4	750	250
5	875	125
6	900	100
7	925	75
8	950	50
9	975	25

### 3.2.4 Mutationsanalysen bei *JAK2* V617F-negativen Patienten

Zwei *JAK2* V617F negative Patienten wurden zur Komplettierung der molekularen Diagnostik auf eine *MPL* W515L und *Calreticulin* Mutation untersucht. Die Analysen erfolgten an Gesamt-DNA aus Gewebeschnitten der Beckenkammtrepanate.

#### 3.2.4.1 Nachweis *MPL* W515L Mutation

Für den Nachweis der *MPL* W515L Mutation wurde eine nested PCR durchgeführt. Dabei wurde für die erste Amplifikationsrunde die Technik des PCR-Clamping mittels *Locked Nucleic Acid* (LNA) eingesetzt. Bei der verwendeten DNA handelt es sich um extrahierte Gesamt-DNA. Die Extraktion erfolgte nach der in Kap. 3.2.2.1 beschriebenen Methodik.

##### 3.2.4.1.1 Funktion der LNA

Zum Nachweis von Mutationen mit sehr niedriger Allelfrequenz hat sich die Methode des LNA (*Lockes Nucleic Acid*) - medierten PCR-clamping als hilfreich erwiesen. Bei der LNA handelt es sich um ein modifiziertes Ribonukleinsäure-Nukleotid, dessen C2- und C4-Atom der Ribose durch eine Sauerstoff-Methylenbrücke verbunden sind. Durch eine im Vergleich zu DNA-Oligomeren höhere Affinität zur komplementären Sequenz hybridisiert die LNA an die Wildtyp-Sequenz und inhibiert hierdurch deren Amplifikation (Orum et al., 1993). Im Falle eines mutierten Allels bleibt die Bindung der LNA aufgrund des *Mismatches* weitgehend aus und das mutierte Allel kann präferenziell amplifiziert werden. Das PCR-clamping dient der Steigerung der Sensitivität beim Mutationsnachweis mittels PCR.

### 3.2.4.1.2 LNA-nested-PCR und Schmelzpunktanalyse

Bei einer *nested*-PCRs werden zwei PCR mit verschachtelten Primern nacheinander durchgeführt. Hierdurch wird insbesondere die Sensitivität der Untersuchung erhöht und die Spezifität weiter gesteigert.

Die erste PCR wurde analog zur konventionellen PCR (Kap. 3.2.2.2) durchgeführt. Die verwendeten Primer (Primer-Paar: MPL F / c-kit MPL R) wurden so gewählt, dass sie den zu untersuchenden DNA-Abschnitt einschließen.

Bei der zweiten PCR wurden Primer eingesetzt die innerhalb der bereits amplifizierten Sequenz binden (Primer-Paar: MPL\_F und MPL\_R), wodurch die Spezifität der Reaktion noch einmal erhöht wird.

Ansatz PCR1 pro Sample:

- 1,5 µl 10xBuffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15mM MgCl, 0,01 % (w/v) Gelatine, Applied Biosystems) + dNTPS
- 1,5µl Primer MPL F (10µM, TIB Molbiol)
- 0,75µl c-kit MPL R (10µM, TIB Molbiol)
- 0,375 MPL-LNA (1µM, TIB Molbiol)
- 0,1 µl AmpliTaq Gold (5U/µl, Applied Biosystems)
- 9,8 µl H<sub>2</sub>O, PCR Grade
- 1 µl extrahierte DNA oder *MPL* W515L-DNA (Positivkontrolle) oder ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)

Ansatz PCR2 pro Sample:

- 1,5 µl 10 x Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15mM MgCl, 0,01 % (w/v) Gelatine, Applied Biosystems)+ dNTP
- 0,9 µl Primer MPL\_F (10 µM, TIB Molbiol)
- 0,9 µl Primer MPL\_R (10 µM, TIB Molbiol)
- 0,09 µl AmpliTaq Gold (5U/µl, Applied Biosystems)
- 10,49 µl H<sub>2</sub>O, PCR-Grade
- 1 µl Template PCR1

PCR-Programm: 95° 10'', (95° 20', 60°30''. 72°30'') x 40, 72°5

Unmittelbar im Anschluss an die LNA-nested-PCR erfolgte die Genotypisierung mittels Schmelzpunktanalyse am LigthCycler®. Wie in Kap. 3.2.2.3 beschrieben.

Ansatz Schmelzpunktanalyse, Angabe pro Sample:

- 3,72 µl H<sub>2</sub>O
- 0,72 µl MPL-anchor (5µM, TIB Molbiol)
- 0,72 µl MPL-sensor (5µM, TIB Molbiol)
- 0,84 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, Quiagen)
- 6 µl Template PCR2

PCR-Programm: 95°4';40° →95° in 20'; cooling 40°30'

Bei Vorliegen einer Mutation zeigt sich eine T<sub>m</sub> der Detektionssonde bei 54°C. Im Falle einer Wildtyp-Sequenz liegt T<sub>m</sub> bei 64°C (Pardanani, Levine et al. 2006).

**Tabelle 13:** Übersicht der verwendeten Hybridisierungssonden *MPL W515L*

Sonde	Sequenz	Länge	Position <sup>1</sup> (nt)	T <sub>m</sub> (°C)
MPL-Sensor <sub>1</sub>	5'-CTG CTG CTG AGG TTG CAG T- 3'(FL)*	17	1576-1594	57,8
MPL-Anchor	5'-LC640-TTC CTG CAC ACT ACA GGT ACC GCC-3'-PH	24	1574-1560	64,6

**1:** Mutation MPL für W515L (TTG → TTG, Tryptophan (W)→ Leucin (L) an Position 1589;

T<sub>m</sub> = Schmelzpunkttemperatur)

### 3.2.4.2 Nachweis von *CALR*-Mutationen

Zum Nachweis von *CALR*-Mutationen erfolgte zunächst eine Extraktion der Gesamt-DNA analog zu Kap. 3.2.2.1. Die Amplifikation der extrahierten DNA wurde mit einer konventionellen PCR im automatisierten Thermocycler (Veriti 96 Well Thermocycler, Applied Biosystems) durchgeführt.

Ansatz PCR:

- 19,10 µl H<sub>2</sub>O, PCR-Grade
- 3,00 µl 10 x Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15mM MgCl, 0,01 % (w/v) Gelantine, Applied Biosystems) + dNTPs
- 3,00 µl Primer Cal9 F (1,0 µM)
- 1,50 µl Primer Cal9 R2 (0,5 µM)
- 1,20 µl MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM; Qiagen)
- 0,20 µl AmpliTaq Gold (0,03 U/µl; Applied Biosystems)
- 2,0 µl extrahierte DNA oder *Calreticulin*-DNA (Positivkontrolle) oder ddH<sub>2</sub>O (Negativkontrolle)

PCR-Programm: 95°5',(95°20'',62°20'',72°20'') x 40, 72°5'; 4°C ∞

**Tabelle 14:** Übersicht der verwendeten Primer *CALR*

Primer	Sequenz	Länge	Position <sup>1</sup> (nt)	Tm (°C)
CAL9 F	5'- GCC CTG AGG TGT GTG CTC TG - 3'	20 nt	p.351	63
CAL9 R2	5'- GGC CTC AGT CCA GCC CTG -3'	18 nt	p. 412	62

Die Detektion der Mutation erfolgte über eine Sequenzierung nach der Sangermethode.

#### 3.2.4.2.1 Agarosegelelektrophorese

Nach Amplifikation der DNA wurden die DNA-Fragmente im Agaroesgel (3% Agarose; 3µl Ethidiumbromid in 100ml Agarose; 1 x TAE-Buffer) elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe eines UV-Transluminators detektiert und anschließend mit einer Kamera dokumentiert. Als Größenstandard wurde der peqGOLD DNA-Sizer XII (PEQLAB Biotechnologie GmbH) verwendet. Die angelegte Spannung betrug 110V.

#### 3.2.4.2.2 Gelextraktion und Aufreinigung der DNA

Für die Gelextraktion der DNA-Fragmente wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchlaufen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll.

#### 3.2.4.2.3 Sangersequenzierung

Die Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte wurde extern durch die Firma Sequiserve mittels Sangersequenzierung durchgeführt.

#### 3.2.4.2.4 Auswertung der Sangersequenzierung

Für die Auswertung der Sangersequenzierung orientierten wir uns an den von Klampfl, Gisslinger et al. (2013) beschriebenen Mutationen. Klampfl, Gisslinger et al. (2013) wiesen 36 verschiedene Insertionen und Deletionen auf dem Calreticulin Gen im Exon 9 nach. Die am häufigsten beschriebene Mutation ist eine 52 bp lange Deletion, die einen *frameshift* des C-Terminus bedingt (Typ I Mutation).

---

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie führten wir *JAK2* V617F Mutationsanalysen an einem Kollektiv von insgesamt 22 Patienten durch. Das Kollektiv setzte sich zusammen aus Patienten mit PV (n=5), Patienten mit ET (n=4) und Patienten mit PMF (n=13). Von den 22 untersuchten Patienten waren zehn männlichen und zwölf weiblichen Geschlechts. Das Alter der Patienten lag zwischen 24 und 89 Jahren. Die Altersverteilung innerhalb der Subgruppen ist der Tabelle 15 zu entnehmen.

In einem ersten Schritt wurde die Entität der MPN anhand histomorphologischer Kriterien beurteilt, um sicherzustellen, dass ausschließlich Fälle mit typischer Morphologie einer weiteren molekularen Analyse zugeführt wurden. Die Knochenmarkshistologie der Patienten mit **PV** zeigte demnach eine trilineare Steigerung der Hämatopoese mit einer entsprechend mäßig- bis hochgradigen Verminderung der Adipozyten (Bild der sogenannten Panmyelose). Dies war ein zentrales Unterscheidungskriterium gegenüber der ET. Die Erythro-, Megakaryo- und Granulopoese waren bei allen untersuchten Patienten mit PV ausreifend. Die Megakaryozyten wiesen Atypien auf, darunter teilweise auffallend große Formen atypisch hyperlobulierter hyperchromatischer Kerne, Zeichen einer Emperipolesis und Bildung von disseminierten Gruppen und kleinen lockeren Clustern. Eine Retikulinfibrose ersten Grades (MF-1) war lediglich bei einem der fünf Patienten mit PV (PV3) zu erkennen.

Bei den untersuchten Patienten mit **PMF** zeigte sich ebenfalls ein hyperzelluläres Knochenmark mit Betonung der Granulo- und Megakaryopoese (siehe Abbildung 13). Die Granulopoese war gesteigert, ausreifend und teilweise eosinophil betont (Vermehrung eosinophiler Granulozyten). Bei dem Patienten PMF1, zeigte sich ein mäßig verdichtetes Retikulinfasernetz im Sinne einer Retikulinfibrose zweiten Grades (MF-2). Alle anderen 12 Patienten der PMF-Gruppe wiesen eine Retikulinfibrose ersten Grades auf (MF-1). Des Weiteren konnte typischerweise eine diffus und/oder fokal akzentuierte Vermehrung auffallend pleomorpher, hier hypolobulierter („wolkenförmig“ imponierender) Megakaryozyten mit Ausbildung disseminierter Gruppen und Cluster, nachgewiesen werden. Konventionell morphologisch war bei keinem der Patienten ein Blastenexzess erkennbar. Die Zahl CD34 exprimierender Progenitorzellen war bei den untersuchten Patienten nicht erhöht. Die Erythropoese zeigte sich teils leicht hypoplastisch, teils waren disseminierte irregulär wirkende Nester einer linksverschobenen Erythropoese zu beobachten.

Die untersuchten Patienten mit **ET** wiesen histologisch typischerweise eine weitgehend normale Zellularität und eine moderat gesteigerte Megakaryopoese mit mäßigen Atypien auf. Diese bestanden auch hier in einer Clusterbildung und Ausbildung atypischer Riesenformen, bevorzugt mit hyperlobulierten („Hirschgeweihartigen“) Zellkernen (siehe Abbildung 13). Die Erythropoese war quantitativ normal und ohne Atypien ausreifend. Die Granulopoese war teilweise leicht vermehrt mit einem gering vermehrten Anteil an eosinophilen Granulozyten und deren Vorstufen. Auch in der

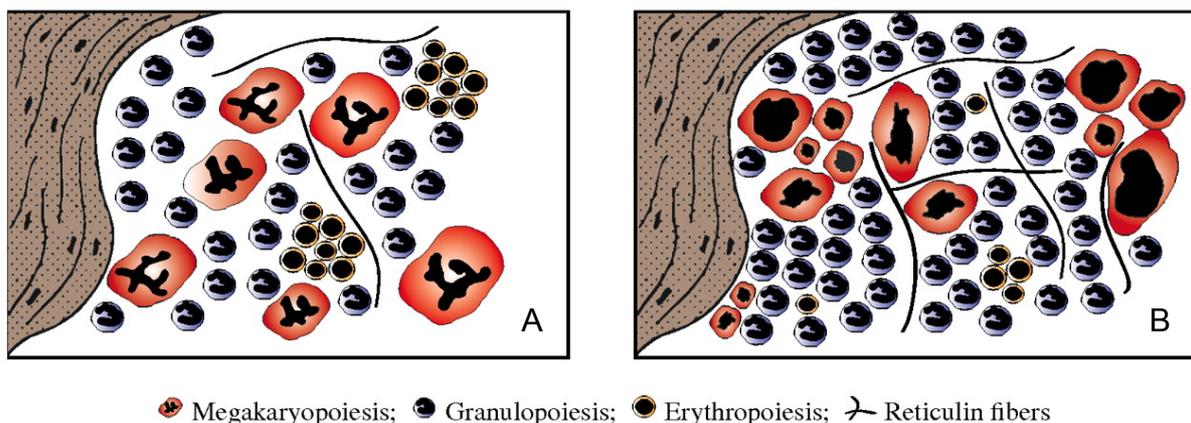
Silberfärbung konnte bei keinem der Patienten eine Faservermehrung nachgewiesen werden (MF-0). Die Zellularität war teilweise minimal gesteigert.

Für die endgültige Diagnosestellung wurden im Rahmen dieser Arbeit, wie oben beschrieben, Fälle mit jeweils charakteristischer Morphologie ausgewählt, da nicht in allen Fällen die entscheidenden klinischen Informationen, wie hämatologische Laborparameter, die Frage einer Splenomegalie und der Therapiestatus geklärt werden konnte. Das Alter und Geschlecht, sowie eruierbare Laborparameter sind in Tabelle 15 angegeben. Insgesamt wurde bei sieben der 22 untersuchten Patienten ein Hämoglobinwert  $\geq 16.5$ g/dl gemessen. Davon waren jeweils drei Patienten aus der PV und PMF-Gruppe sowie ein Patient aus der ET-Gruppe. Der höchste Hämoglobinwert imponierte bei einem Patienten mit PV. Der verwendete Referenzbereich des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der LMU lag zwischen 13.5 und 17.5g/dl.

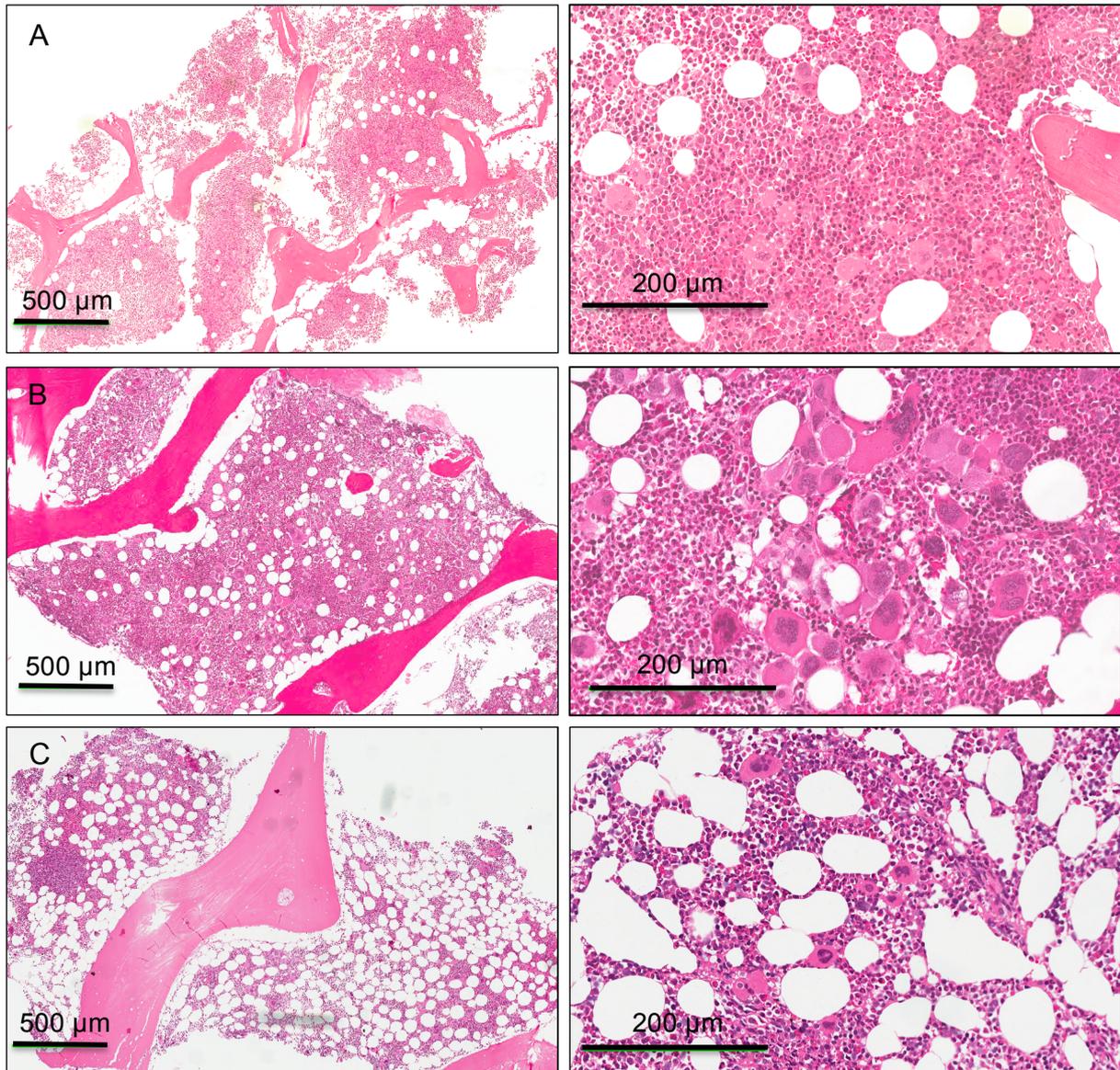
Bei einem Patienten mit PV, drei Patienten mit ET sowie bei drei Patienten mit PMF wurden erniedrigte Hämoglobinwerte gemessen. Bei eindeutigen histomorphologischen Befunden und Nachweis einer *JAK2* Mutation V617F befand sich der PV-Patient offenbar in der sogenannten „präpolyzythämischen Phase“ der Erkrankung (WHO 2008).

Eine Leukozytose (Leukozyten  $>9800/\mu\text{l}$ ) wurde bei 14 der 22 untersuchten Patienten gemessen. Davon drei Patienten mit PV, acht Patienten mit PMF und drei Patienten mit ET.

Bei allen Patienten mit PV und ET sowie bei zehn von 13 Patienten mit PMF zeigte sich eine Thrombozytose (Thrombozyten  $>328.000/\mu\text{l}$ ). Interessanterweise wurden die höchsten Thrombozytenwerte (Thrombozytenzahl:  $1.014.000/\mu\text{l}$ ) innerhalb der ET-Gruppe bei einem Patienten (ET3) mit Nachweis einer *CALR* Typ I-Mutation beobachtet. Bei diesem Patienten, zeigten sich im Blutbild zusätzlich eine milde Leukozytose sowie eine Anämie.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der typischen Histologie einer A.) ET mit gesteigerter Megakaryopoese mit den charakteristischen „Hirschwurmartigen“ Zellkernen der Megakaryozyten sowie einer nicht relevant gesteigerten Granulo- und Erythropoese B.) frühe Phase einer PMF mit einem hyperzellulären Knochenmark mit gesteigerter Granulo- und Megakaryopoese, die Erythropoese ist gering vermindert, die Megakaryozyten befinden sich in lockeren Clustern, die Zellkerne der Megakaryozyten sind pleomorph (Thiele, Kvasnicka et al. 2011)



**Abbildung 14:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer Knochenmarksbiopsie mit dem klassischen Bild einer Polyzythämia vera mit deutlich hyperzellulärem Knochenmark (A), einer Primären Myelofibrose, ebenfalls mit einem hyperzellulären Knochenmark mit betonter Granulo- und Megakaryopoese sowie Clusterbildung der atypischen, pleomorphen Megakaryozyten (B) und einer Essentiellen Thrombozythämie mit den typischen Hirschgeweihartigen Zellkernen der Megakaryozyten (C)

**Tabelle 15:** Detaillierte Patientendaten, Laborparameter und Molekularbefunde

w = weibliche Patienten, m = männliche Patienten, MP = Schmelzpunktanalysen, Pyro = Pyrosequenzierungen, n.a. = Patienten-Proben, bei denen die DNA in der PCR nicht amplifiziert werden und somit mit dem jeweiligen Verfahren nicht analysiert werden konnte, x = nicht vorliegende Laborparameter

	Alter	Geschlecht	Hämoglobinwert in g/dl	Thrombozyten in G/l	Leukozyten in G/l	MP	Pyro
<b>PV1</b>	67	w	13,6	442	21,7	+	84
<b>PV2</b>	61	w	16,5	385	16,3	+	81
<b>PV3</b>	78	w	11	773	9,8	+	77
<b>PV4</b>	36	w	19,5	486	8,8	+	n.a.
<b>PV5</b>	39	m	17,2	997	17,7	+	29
<b>PMF1</b>	71	w	x	x	x	+	n.a.
<b>PMF2</b>	68	w	13,9	199	10	+	78
<b>PMF3</b>	57	w	16	664	22,1	+	62
<b>PMF4</b>	50	w	14,8	972	9,4	+	26
<b>PMF5</b>	89	m	11	1539	24,12	n.a.	38
<b>PMF6</b>	61	m	9,9	491	4,7	+	42
<b>PMF7</b>	72	w	16,1	878	15,2	+	33
<b>PMF8</b>	55	w	14,6	541	14	+	n.a.
<b>PMF9</b>	86	m	10,9	610	27,54	+	80
<b>PMF10</b>	82	w	17,1	741	11,9	+	27
<b>PMF11</b>	24	m	16,6	422	9,16	+	13
<b>PMF12</b>	64	m	14,4	1143	8,6	+	34
<b>PMF13</b>	76	m	19,4	294	14,1	+	26
<b>ET1</b>	81	m	11,7	707	10,3	+	28
<b>ET2</b>	74	m	13,4	588	8	+	30
<b>ET3</b>	86	w	11,8	1014	13,2	-	n.a.
<b>ET4</b>	66	m	17,2	389	16,2	+	21

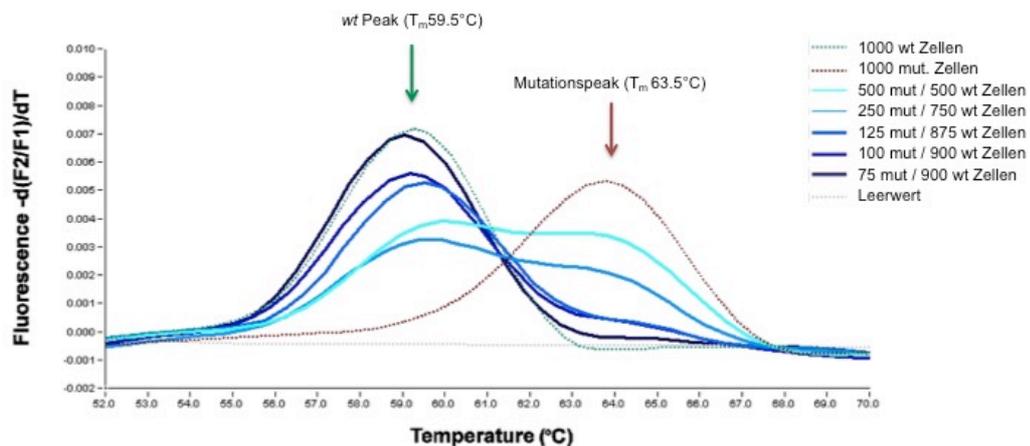
## 4.2 Ermittlung der analytischen Sensitivität

Um die analytische Sensitivität, das heißt die erforderliche Mindestanzahl an *JAK2* V617F mutierten mikrodisezierten Zellen zu ermitteln, bei der sich ein mutationsspezifisches Signal (Peak) in der Schmelzpunktanalyse darstellt, stellten wir eine Verdünnungsreihe nach dem in Kap. 3.2.2.5 beschriebenen Schema her.

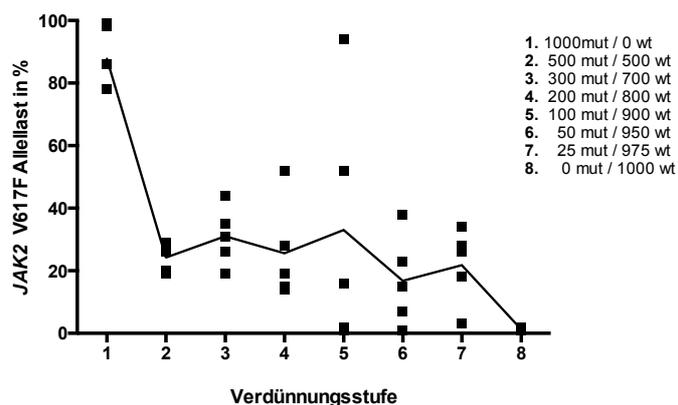
Es zeigte sich, dass mindestens 100 mikrodisezierte mutierte Zellen in einem Gemisch aus 1000 mikrodisezierten Zellen, entsprechend 10% bei angenommener homozygoter Mutation, erforderlich sind, damit sich, vor einem übermäßigen Hintergrund aus *JAK2* wt-Zellen ein signifikanter Mutationspeak in der Schmelzpunktanalyse darstellt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Sensitivität der verwendeten Methode.

In den Pyrosequenzierungen konnte bereits bei 25 mikrodisezierten *JAK2* V617F positiven Zellen, entsprechend 2.5% bei angenommener homozygoter Mutation, ein Mutationssignal gemessen werden.

A.



B.



**Abbildung 15:** Verdünnungsreihe (A) Für die Schmelzpunktanalyse sind mindestens 100 mikrodisezierte mutierte Zellen in einem Gemisch aus 1000 mikrodisezierten Zellen erforderlich damit sich ein signifikanter Mutationspeak in der Schmelzpunktanalyse darstellt; (B) In den Pyrosequenzierungen konnte bereits ab 25 mikrodisezierten *JAK2* V617F positiven Zellen, ein Mutationssignal gemessen werden.

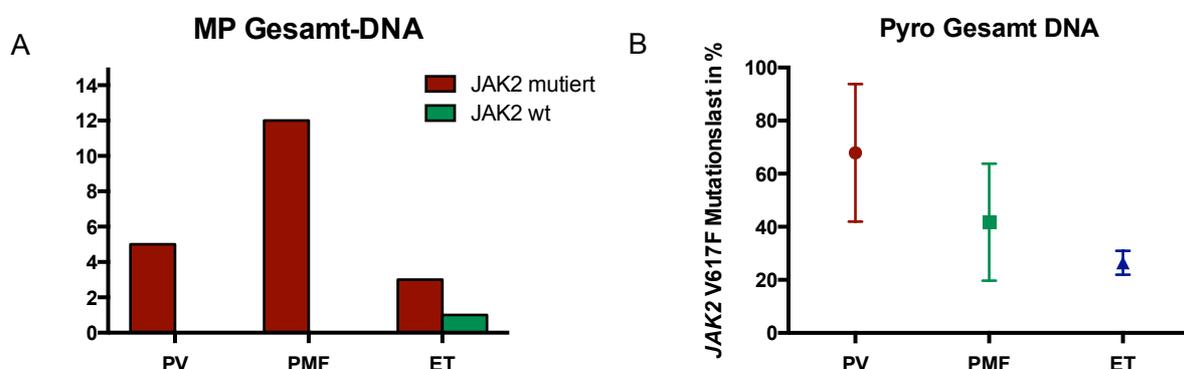
### 4.3 Der Mutationsstatus der untersuchten MPN Patienten

Um den *JAK2* V617F Mutationsstatus der Patienten dieser Studie zu bestimmen bzw. zu überprüfen, führten wir zunächst Mutationsanalysen an extrahierter Gesamt-DNA durch (siehe Kap.3.2.2.1). Von jedem Patienten wurden jeweils drei PCR-Templates mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen untersucht. Bei 16 von 22 untersuchten Patienten wurde die *JAK2* V617F Mutation übereinstimmend durch beide Analyseverfahren in der extrahierten Gesamt-DNA nachgewiesen. Die Rate der im Codon 617 mutierter Allele war in der PV-Gruppe am höchsten und lag im Durchschnitt bei 68% (Intervall: 29-84%). Die niedrigste Rate wurde bei den Patienten mit ET gemessen (Durchschnitt: 26%; Intervall: 21-30%).

Bei einem Patienten mit ET (ET3) ergaben die Mutationsanalysen *JAK2* wt im Codon 617. Des Weiteren wurde die *JAK2* V617F Mutation bei dem Patienten PMF8 lediglich in der Gesamt DNA und in den Erythroblasten nachgewiesen. Die weiteren mikrodisezierten Zelllinien waren *JAK2* wt. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden bei diesen beiden Patienten ergänzend *CALR*- und *MPL* W515L-Mutationsanalysen durchgeführt. Die *MPL* W515L Mutation wurde bei keinem der beiden Patienten nachgewiesen. Bei dem Patienten ET3 zeigte sich eine 52bp Deletion im *CALR*-Gen im Sinne einer Typ I Mutation (Klampfl, Gisslinger et al. 2013). Der Patient PMF8 war *CALR* wt.

Bei dem Patienten PMF11 ergaben die Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen ein unterschiedliches Ergebnis. In den Schmelzpunktanalysen stellte sich in drei von drei Schmelzkurven ein schwaches *JAK2* V617F Mutations-spezifisches Signal dar. Die Pyrosequenzierungen ergaben dagegen eine Rate an *JAK2* V617F positiven Allelen von 13% und wurden infolge des zuvor festgelegten *cut-offs* von 20% als *JAK2* wt gewertet.

Aufgrund fehlender PCR-Amplifikate konnten bei dem Patienten PMF5 keine Schmelzpunktanalysen durchgeführt werden. Analog hierzu konnten wegen fehlender Amplifikate in der PCR bei den Patienten PV4, PMF1, PMF8 sowie ET3 keine Mutationsanalysen mittels Pyrosequenzierungen erfolgen.



**Abbildung 16:** *JAK2* V617F Mutationsanalysen an Gesamt DNA mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=21) und (B) Pyro=Pyrosequenzierungen (n=18) Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = primäre Myelofibrose, ET = essentielle Thrombozythämie

## 4.4 Mutationsanalysen an mikrodisektierten Zellen

Im zentralen Schritt dieser Arbeit wurden sieben hämatopoetische Zellreihen (Erythroblasten, Megakaryozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten) hinsichtlich des Auftretens der *JAK2* V617F Mutation und der *JAK2* V617F Allellast untersucht.

Um eine möglichst kontaminationsfreie Separation der Zelllinien zu gewährleisten, wurden die Zellen einer Zellreihe mit quasi spezifischen Antikörpern immunhistochemisch markiert (Kap. 3.2.1). Die eingesetzten Antikörper sind der Tabelle 8 in Kap. 3.2.1 zu entnehmen.

Einen besonders kritischen Punkt dieser Arbeit stellte die Frage dar, ob die *JAK2* V617F Mutation auch in den lymphatischen Zellen (hier T-Lymphozyten) zu finden ist. Aufgrund des besonders lockeren Verteilungsmusters der CD3-positiven T-Lymphozyten und der damit einhergehenden möglichen Überlagerung vor allem durch neutrophile Granulozyten und ihrer Vorstufen, wurde zur Separation der T-Lymphozyten eine immunhistochemische Doppelmarkierung verwendet (CD3/MPO).

Zur Mutationsanalytik und Bestimmung der Allellast wurden von jedem Fall 2000 Zellen der oben genannten Zelllinien mikrodisektiert. Das gewonnene Material wurde wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben für die PCR vorbehandelt und anschließend durch zwei verschiedene PCR-Techniken für die späteren Schmelzpunktanalysen bzw. Pyrosequenzierungen amplifiziert. Je drei PCR-Amplifikate wurden dann zur Genotypisierung mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen analysiert. Jeder einzelne dieser sechs PCR-Ansätze enthielt somit die DNA von ca. 333 Zellkernen.

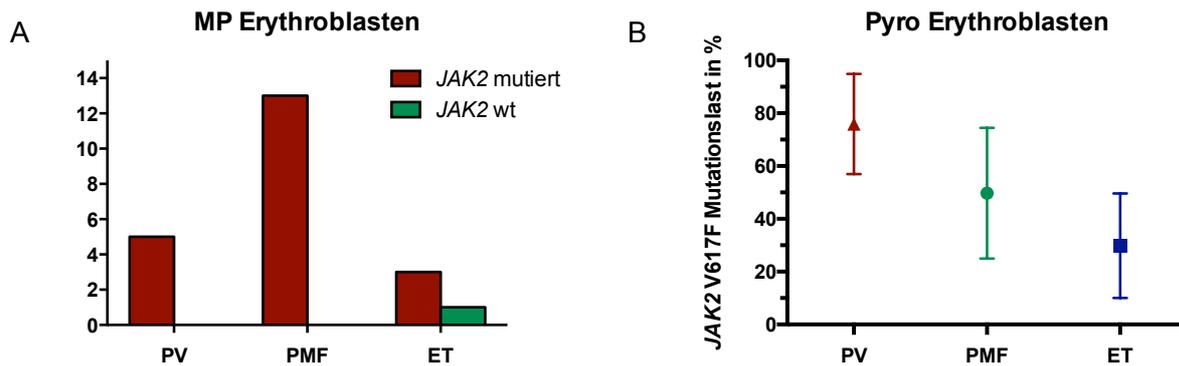
### 4.4.1 Mutationsanalysen an mikrodisektierten Erythroblasten

Die *JAK2* V617F Mutation wurde bei 20 von 22 untersuchten MPN Patienten übereinstimmend in beiden Analyseverfahren in den Erythroblasten nachgewiesen. Bei dem Patienten ET3 ergaben die Mutationsanalysen *JAK2 wt*. Die ermittelte Rate *JAK2* V617F positiver Allele war am höchsten bei den Patienten mit PV (Durchschnitt: 76%, Intervall: 32-96%) und am niedrigsten bei den Patienten mit ET (Durchschnitt: 30%, Intervall: 1-64%).

In der PV-Gruppe wurde die *JAK2* V617F Mutation bei vier von fünf Patienten übereinstimmend in den Erythroblasten detektiert. Die Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele betrug 76% (Intervall: 32-96%). Aufgrund fehlender PCR-Amplifikate konnten bei dem Patienten PV3 keine Pyrosequenzierungen durchgeführt werden. In den korrespondierenden Schmelzpunktanalysen stellten sich in drei von drei Schmelzkurven neben einem deutlichen *JAK2 wt*-Signal, ein niedriger *JAK2* V617F Mutations-spezifischer Peak, im Sinne einer heterozygoten *JAK2* V617F Mutation, dar.

Bei den Patienten mit **PMF** wurde die *JAK2* V617F Mutation bei allen 13 untersuchten Patienten durch beide Analyseverfahren übereinstimmend in den Erythroblasten nachgewiesen. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate mutierter *JAK2* V617F Allele von 51% (Intervall: 1-98%).

In der **ET**-Gruppe wurden die Erythroblasten bei drei von vier Patienten als *JAK2* V617F mutiert gewertet. Bei dem Patienten ET3 waren die Erythroblasten wie bereits weiter oben angeführt *JAK2* wt. Die durchschnittliche Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele in den Erythroblasten bei den Patienten mit ET lag bei 30% (Intervall: 0-64%).



**Abbildung 17:** *JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten Erythroblasten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=22) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=21), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = primäre Myelofibrose, ET = essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.2 Mutationsanalysen an mikrodisektierten Megakaryozyten

In den Megakaryozyten wurde die *JAK2* V617F Mutation bei zwölf von 22 untersuchten MPN-Patienten übereinstimmend durch beide Analyseverfahren nachgewiesen. Bei drei der 22 Patienten ergaben die Mutationsanalysen *JAK2* wt. Analog zu den Analysen an mikrodisektierten Erythroblasten wurde die höchste Rate an *JAK2* V617F positiven Allelen bei den Patienten mit PV beobachtet (Durchschnitt: 56%, Intervall: 0-97%), die niedrigste bei den Patienten mit ET (Durchschnitt: 21%, Intervall 0-98%).

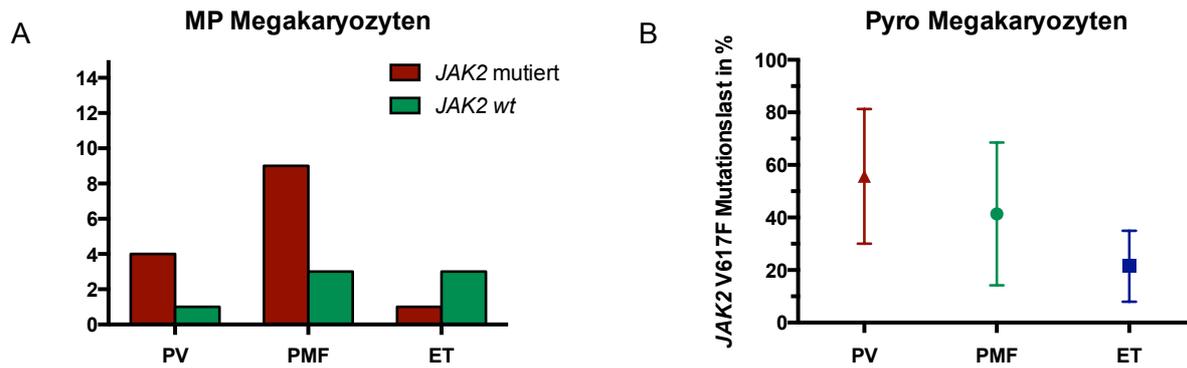
Die Megakaryozyten besitzen ihrem Namen entsprechend einen großen Zellkern. Um die Kerne mittels Lasermikrodisektion zu isolieren waren höhere Laserenergien nötig als bei den anderen untersuchten Zellreihen. Hierdurch könnte es in einem höheren Maß zu einer Schädigung der isolierten DNA gekommen sein. Dies zeigt sich z.B. in einer hohen Anzahl voneinander abweichender Ergebnisse zwischen den beiden Untersuchungsverfahren.

Bei den Patienten mit **PV** wurden die Megakaryozyten bei drei von fünf Patienten als *JAK2* V617F mutiert gewertet. Die Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele in den Megakaryozyten in der PV-Gruppe lag bei 56% (Intervall: 0-97%). Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden unterschieden sich bei den Patienten PV4 und PV5 voneinander. In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten

PV4 stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven ein *JAK2 wt* Peak dar. Die dritte Schmelzkurve zeigte keinen Peak. In den Pyrosequenzierungen wurde die *JAK2 V617F* Mutation nachgewiesen. Hier waren die Ergebnisse innerhalb der Triplets homogen und ergaben eine durchschnittliche Rate im Codon 617 mutierter *JAK2*-Allele von 70%. Bei dem Patienten PV5 stellten sich in den Schmelzpunktanalysen in drei von drei Schmelzkurven sowohl ein Mutations-spezifisches Signal als auch ein *JAK2 wt*-Signal, einer heterozygoten *JAK2 V617F* Mutation entsprechend, dar. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen waren heterogen verteilt (1. 35%, 2. 2%, 3. 0%) und sind damit nicht sicher einzuordnen.

In der Gruppe der Patienten mit **PMF** wurde die *JAK2 V617F* Mutation in den Megakaryozyten bei acht von 13 Patienten übereinstimmend in beiden Analyseverfahren nachgewiesen. Bei den Patienten PMF7 sowie PMF8 ergaben die Mutationsanalysen ebenfalls übereinstimmend *JAK2 wt*. In der PMF-Gruppe lag die durchschnittliche Rate *JAK2 V617F* positiver Allele bei 41% (Intervall: 1-94%). Bei den Patienten PMF2 und PMF10 unterschieden sich die Ergebnisse der Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen voneinander. In drei von drei Schmelzkurven stellten sich, bei dem Patienten PMF2, ein eindeutiger *JAK2 V617F* Mutations-Peak dar. Im Gegensatz dazu lag die durch die Pyrosequenzierungen ermittelte Rate an *JAK2 V617* positiven Allelen bei 4%  $\hat{=}$  *JAK2 wt*. Bei dem Patienten PMF10 verhielt es sich genau umgekehrt. In zwei von drei Schmelzkurven zeigte sich ein dezentes *JAK2 V617F* Mutations-spezifisches Signal. Dieses kann aufgrund der nur sehr geringen Stärke des Signals nicht als eindeutiger Nachweis einer *JAK2 V617F* Mutation gewertet werden. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen waren mit einer durchschnittlichen Rate an mutierten *JAK2* Allelen von 72%, eindeutig *JAK2 V617F* positiv. Aufgrund fehlender Amplifikate in der PCR konnten bei dem Patienten PMF12 keine Schmelzpunktanalysen durchgeführt werden. Mittels Pyrosequenzierung wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei diesem Patienten in den Megakaryozyten nachgewiesen.

Bei den Patienten mit **ET** stimmten die Ergebnisse beider Untersuchungsverfahren nur bei dem Patienten ET1 miteinander überein. Hier ergaben die Mutationsanalysen *JAK2 wt*. Durch die Pyrosequenzierungen wurde eine Rate *JAK2 V617F* positiver Allele in der ET-Gruppe von 21% ermittelt (Intervall: 5-98%). Bei dem Patienten ET3 konnten in der PCR keine Amplifikate für die weiteren Analysen mittels Pyrosequenzierungen generiert werden. In den Schmelzpunktanalysen waren die Megakaryozyten bei diesem Patienten eindeutig *JAK2 wt*. Bei dem Patienten ET2 stellten sich in den Schmelzpunktanalysen in zwei von drei Schmelzkurven *JAK2 V617F* Mutations-spezifische Peaks dar. In einer der drei Schmelzkurven war lediglich ein schwaches Mutationssignal zu erkennen. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen bei diesem Patienten waren nicht eindeutig einzuordnen. Die ermittelte Rate *JAK2 V617F* positiver Allele lag bei 18% und liegt damit knapp unterhalb des festgelegten *Cutoffs* von 20%. Die Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten ET4 ergaben *JAK2 wt*. Bei den Pyrosequenzierungen gab es einen Ausreißer innerhalb der Triplets (1. 98%, 2. 5%, 3. 6%), welcher durch eine Kontamination der Probe bedingt sein könnte.



**Abbildung 18:** *JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodissektierten Megakaryozyten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=21) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=21), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.3 Mutationsanalysen an mikrodissektierten neutrophilen Granulozyten

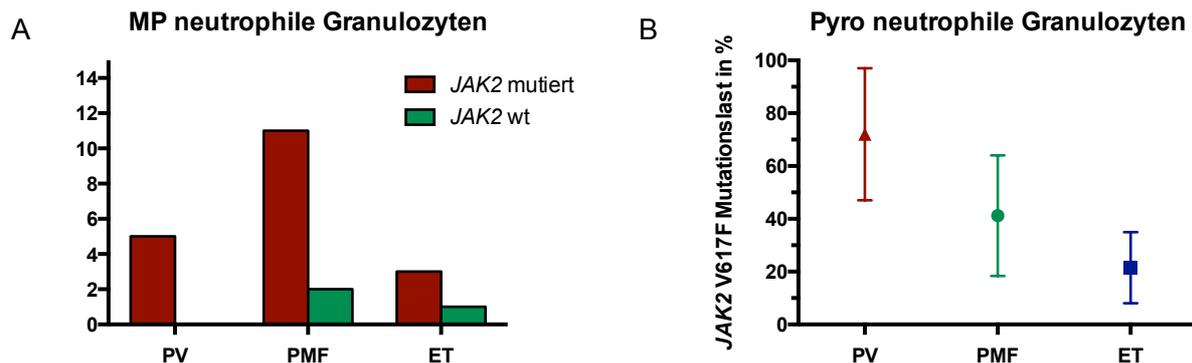
In den Mutationsanalysen an mikrodissektierten neutrophilen Granulozyten wurde die *JAK2* V617F Mutation bei 17 der 22 untersuchten MPN-Patienten nachgewiesen. Bei zwei der 22 Patienten ergaben die Mutationsanalysen *JAK2 wt*. Die Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele war am höchsten bei den Patienten mit PV (Durchschnitt 63%, Intervall 25-97%) und am niedrigsten bei den Patienten mit ET (Durchschnitt: 21%, Intervall: 1-39%).

Bei den Patienten mit **PV** wurde die *JAK2* V617F Mutation übereinstimmend durch beide Analysemethoden bei allen Patienten in den neutrophilen Granulozyten detektiert. Die Rate *JAK2* V617F positiver Allele in den neutrophilen Granulozyten lag bei 63% (Intervall: 25-97%).

In der **PMF**-Gruppe waren neun der 13 untersuchten Patienten *JAK2* V617F positiv. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele von 41% (Intervall: 4-87%). Bei folgenden Patienten stimmen die Ergebnisse beider Analyseverfahren nicht miteinander überein: PMF4, PMF11, und PMF12. Die Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF4 ergaben in drei von drei Schmelzkurven neben einem *JAK2 wt*-Peak ein Mutations-spezifisches Signal im Sinne einer heterozygoten *JAK2* V617F Mutation. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen waren hingegen heterogen verteilt (1. 4%, 2. 16%, 3. 28%) und sind somit nicht sicher einzuordnen. Analog hierzu zeigten sich bei dem Patienten PMF11 in drei von drei Schmelzkurven schwache *JAK2* V617F Mutations-spezifische Peaks. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele von 11% und wurden aufgrund der festgelegten Nachweisgrenze von 20% als *JAK2 wt* gewertet. Der *Cutoff* von 20% wurde gewählt um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, dabei wurde in Kauf genommen, dass Patienten bei denen *JAK2* V617F positive Allele nur in geringer Frequenz vorkommen nicht als Träger der *JAK2* V617F Mutation erkannt werden.

Bei dem Patienten PMF12 ergaben die Schmelzpunktanalysen *JAK2 wt*. In den Pyrosequenzierungen waren die neutrophilen Granulozyten *JAK2 V617F* mutiert.

Bei den Patienten mit ET waren die neutrophilen Granulozyten bei drei von vier Patienten *JAK2 V617F* positiv. Wie bereits bei der Analyse der Gesamt-DNA, als auch bei den Mutationsanalysen an mikrodisektierten Erythroblasten und Megakaryozyten waren die neutrophilen Granulozyten bei dem Patienten ET3 *JAK2 wt*. Die durch die Pyrosequenzierungen ermittelte Rate mutierte *JAK2* Allele in den neutrophilen Granulozyten in dieser Gruppe lag bei 21% (Intervall: 1-39%).



**Abbildung 19:** *JAK2 V617F* Mutationsanalysen an mikrodisektierten neutrophilen Granulozyten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=22) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=22), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.4 Mutationsanalysen an mikrodisektierten eosinophilen Granulozyten

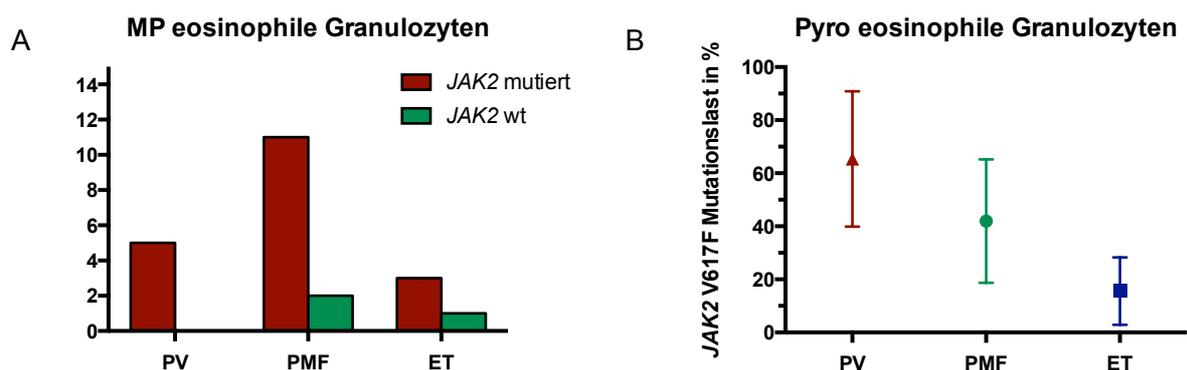
In den EPX-positiven eosinophilen Granulozyten wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei 16 der 22 untersuchten MPN-Patienten übereinstimmend in den Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen nachgewiesen. Bei den Patienten PMF8 sowie ET3 waren die eosinophilen Granulozyten *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben die höchste Rate an mutierten *JAK2* Allelen bei den Patienten mit PV (Durchschnitt: 65%, Intervall: 1-97%) und die niedrigste bei den Patienten mit ET (Durchschnitt: 16%, Intervall: 1-33%).

In der PV-Gruppe wurde die *JAK2 V617F*-Mutation durch beide Analyseverfahren bei allen Patienten in den eosinophilen Granulozyten nachgewiesen. Die ermittelte Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele lag bei 65% (Intervall: 1-97%).

Bei den Patienten mit PMF wurden die eosinophilen Granulozyten bei neun von 13 untersuchten Patienten als *JAK2 V617F* mutiert gewertet. Wie bereits erwähnt wurde, waren die mikrodisektierten EPX-positiven Zellen bei dem Patienten PMF8 *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate an mutierten *JAK2* Allelen in den eosinophilen Granulozyten von durchschnittlich 42% (Intervall: 3-96%). Die Ergebnisse beider Analyseverfahren bei den Patienten PMF11 und PMF12 unterschieden sich voneinander. In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF11 zeigte sich in drei von drei

Schmelzkurven sowohl ein deutlicher *JAK2 wt* Peak, als auch ein *JAK2 V617F* Mutations-spezifisches Signal. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine niedrige Rate im Codon 617 mutierte *JAK2* Allele (Durchschnitt:14%) und wurden als *JAK2 wt* interpretiert. Bei dem Patienten PMF12 verhielt es sich genau umgekehrt. In den Schmelzpunktanalysen stellten sich in zwei von drei Schmelzkurven lediglich *JAK2 wt*-Peaks dar. In einem der drei Ansätze konnte am ehesten aufgrund fehlender PCR-Amplifikate keine Schmelzkurve generiert werden. Die Pyrosequenzierungen bei diesem Patienten ergaben heterogene Ergebnisse (1. 93%, 2. 3%, 3. 65%) und sind somit nicht sicher einzuordnen.

In der Gruppe der Patienten mit **ET** wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei zwei der vier untersuchten Patienten übereinstimmend durch beide Untersuchungsverfahren nachgewiesen. Bei dem Patienten ET3 waren die eosinophilen Granulozyten *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine durchschnittliche Rate mutierter *JAK2* Allele von 16%,  $\cong$  *JAK2 wt* (Intervall: 1-33%). Bei dem Patienten ET4 stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven neben einem *JAK2 wt*-Peak, ein schwaches *JAK2 V617F* Mutationssignal dar. In einer der Schmelzkurven zeigte sich ein deutliches Mutationssignal mit einem schwachen *JAK2 wt* Peak. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine sehr niedrige Rate an mutierten *JAK2* Allelen von 8%  $\cong$  *JAK2 wt*.



**Abbildung 20:** *JAK2 V617F* Mutationsanalysen an mikrodissektierten eosinophilen Granulozyten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=22) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=21), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.5 Mutationsanalysen an mikrodissektierten basophilen Granulozyten

In den basophilen Granulozyten wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei elf der 22 untersuchten MPN-Patienten detektiert. In vier Fällen waren die basophilen Granulozyten *JAK2 wt*. Die durch die Pyrosequenzierungen ermittelte Rate an *JAK2 V617F* positiven Allelen war am höchsten bei den Patienten mit PV (Durchschnitt: 54%, Intervall: 19-100%) und am niedrigsten bei den Patienten mit ET (Durchschnitt: 9%, Intervall: 1-24%).

Aufgrund einer sehr geringen Anzahl an basophilen Granulozyten in dem verwendeten Untersuchungsmaterial und einer dementsprechend geringen kumulativen DNA-Menge, gab es eine hohe Anzahl an Fällen bei denen die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden nicht miteinander

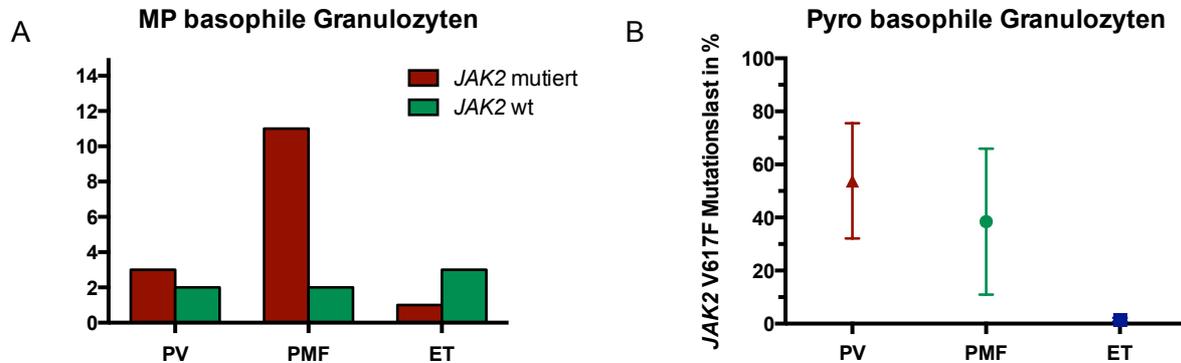
übereinstimmen (n=5) bzw. bei denen aufgrund fehlender PCR-Amplifikate keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden konnten (n=3).

Bei den Patienten mit **PV** wurde die *JAK2* V617F Mutation bei zwei von fünf Patienten in beiden Analysemethoden übereinstimmend in den basophilen Granulozyten nachgewiesen. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine durchschnittliche Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele von 54% (Intervall: 19-100%). Bei den Patienten PV4 sowie PV5 unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Untersuchungsverfahren voneinander. In den Schmelzpunktanalysen des Patienten PV4 stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven ein *JAK2 wt* Peak dar. In einer Schmelzkurve zeigte sich, am ehesten aufgrund fehlender PCR-Amplifikate kein Ausschlag. Die ermittelte Rate an *JAK2* V617F positiven Allelen in den korrespondierenden Pyrosequenzierungen lag bei 43%. Bei dem Patienten PV5 stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven ein *JAK2 wt*-Peak dar. In einer Schmelzkurve zeigte sich neben dem *JAK2 wt* Peak, ein *JAK2* V617F Mutations-spezifisches Signal, im Sinne einer heterozygoten *JAK2*-Mutation. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen bei diesem Patienten waren homogen (Durchschnitt: 35%). Aufgrund fehlender Amplifikate in der PCR konnten bei dem Patienten PV2 keine weiteren Analysen mittels Pyrosequenzierung erfolgen. Die Schmelzpunktanalysen ergaben *JAK2 wt*.

In der **PMF**-Gruppe wurde die *JAK2* Mutation im Codon 617 bei acht von 13 Patienten in den basophilen Granulozyten detektiert. Analog zu den anderen untersuchten Zelllinien, waren die basophilen Granulozyten bei dem Patienten PMF8, *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine durchschnittliche Rate an *JAK2* V617F positiven Allelen von 38% (Intervall: 1-97%). Aufgrund fehlender PCR-Amplifikate konnten bei dem Patienten PMF6 keine Pyrosequenzierungen durchgeführt werden. In den Schmelzpunktanalysen stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven ein *JAK2* V617F Mutations-spezifischer Peak dar. Bei den Patienten PMF7, PMF10 sowie PMF12 ergaben beide Analyseverfahren ein unterschiedliches Ergebnis. In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF7 zeigte sich in zwei von drei Schmelzkurven ein *JAK2* V617F Mutations-spezifischer Peak bei der Analyse der mikrodisssektierten basophilen Granulozyten. In einer der Schmelzkurven stellte sich lediglich ein *JAK2 wt*-Peak dar. In den korrespondierenden Pyrosequenzierungen waren die Ergebnisse innerhalb der Triplets heterogen verteilt: 1. 8%, 2. 1%, 3. 34%. Bei dem Patienten PMF10 stellte sich in drei von drei Schmelzkurven sowohl ein *JAK2 wt*-Peak, als auch ein *JAK2* V617F Mutations-spezifisches Signal dar. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine ermittelte Rate *JAK2* V617F positiver Allele von 8%. Hierbei gilt es zu beachten, dass die Ergebnisse innerhalb der Triplets nicht stimmig waren (1. 22%, 2. 1%, 3. 2%). In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF12 konnte nur eine von drei Schmelzkurven generiert werden. Diese Schmelzkurve zeigte einen *JAK2 wt* Peak. Die dazugehörigen Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate an mutierten *JAK2* Allelen von 36%.

Bei den Patienten mit **ET** wurden die *JAK2* V617F Mutation bei einem Patienten in den basophilen Granulozyten nachgewiesen. Die 2D7-positiven mikrodisssektierten Zellen der Patienten ET1 und ET3

waren *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine durchschnittliche Rate an *JAK2 V617F* positiven Allelen von 9% (Intervall: 1-24%). Bei dem Patienten ET4 konnten aufgrund fehlender Amplifikate in der PCR keine Pyrosequenzierungen erfolgen. Die korrespondierenden Schmelzpunktanalysen ergaben *JAK2 wt*.



**Abbildung 21:** *JAK2 V617F* Mutationsanalysen an mikrodisektierten basophilen Granulozyten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=22) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=19), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.6 Mutationsanalysen an mikrodisektierten Mastzellen

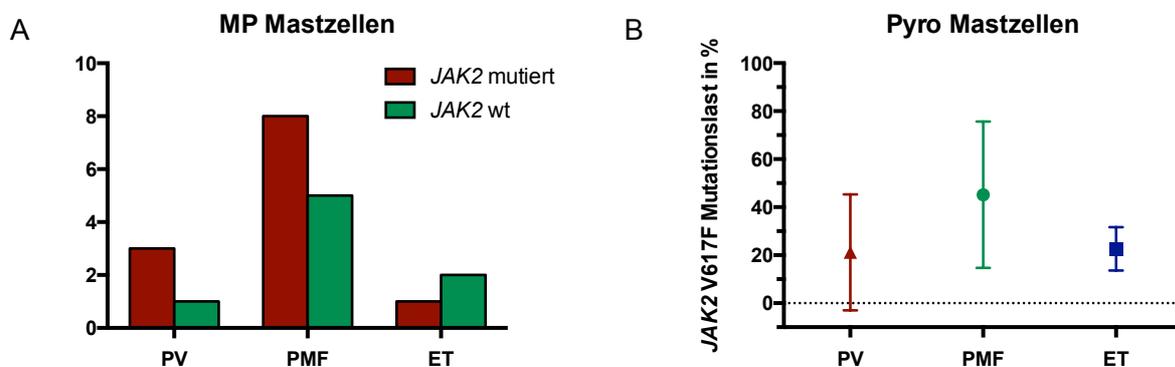
In den Tryptase positiven Mastzellen wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei elf der 22 untersuchten MPN-Patienten nachgewiesen. Bei vier Patienten ergaben die Mutationsanalysen *JAK2 wt*. Die höchste Rate an *JAK2 V617F* positiven Allelen wurde bei den Patienten mit PMF beobachtet (Durchschnitt: 45%, Intervall: 1-99%). Die niedrigste bei den Patienten mit PV (Durchschnitt: 21%, Intervall: 1-97%).

Analog zu den basophilen Granulozyten kamen die Mastzellen nur in einer sehr geringen Anzahl in den untersuchten Knochenmarkstrepanaten vor. In einigen Fällen gelang es nicht, jeweils tausend Mastzellen für die Analysen mittels Pyrosequenzierungen und Schmelzpunktanalysen zu isolieren. Dies spiegelt sich zum einen in heterogenen Ergebnissen und zum anderen durch fehlende Ergebnisse wider.

Bei zwei von fünf Patienten mit **PV** wurde die *JAK2 V617F* Mutation übereinstimmend durch beide Analysemethoden nachgewiesen. Die mikrodisektierten Mastzellen des Patienten PV2 waren ebenfalls übereinstimmend *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen ergaben eine durchschnittliche Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele von 21% (Intervall: 1-97%). Bei dem Patienten PV1 stellte sich in drei von drei Schmelzkurven neben einem *JAK2 wt* Peak, ein eindeutiger *JAK2 V617F* Mutations-spezifischer Peak dar. In den korrespondierenden Pyrosequenzierungen lag die Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele bei 1% ( $\neq$  *JAK2 wt*). Die beiden Ergebnisse unterscheiden sich erheblich voneinander. Bei dem Patienten PV5 konnten nicht genügend Mastzellen für die Mutationsanalysen isoliert werden.

In der **PMF**-Gruppe wurde die *JAK2* V617F Mutation bei acht von dreizehn Patienten in den Mastzellen detektiert. Bei den Patienten PMF8 sowie PMF11 waren die Mastzellen *JAK2 wt*. Die Pyrosequenzierungen in dieser Gruppe ergaben eine durchschnittliche Rate *JAK2* V617F positiver Allele von 45% (Intervall: 1-99%). Bei dem Patienten PMF4 konnten infolge fehlender PCR-Amplifikate keine Pyrosequenzierungen durchgeführt werden. Die korrespondierenden Schmelzpunktanalysen ergaben *JAK2 wt*. Bei den Patienten PMF5 und PMF10 unterschieden sich die Ergebnisse der Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen voneinander. In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF5 stellten sich in zwei von drei Schmelzkurven *JAK2 wt* Peaks dar. In einer Schmelzkurve zeigte sich kein Ausschlag. In den dazugehörigen Pyrosequenzierungen konnten ebenfalls nur zwei von drei Amplifikaten generiert und ausgewertet werden, welche widersprüchlich waren (1. 70%, 2. 13%). Die Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF10 ergaben eindeutig *JAK2 wt*. In den entsprechenden Pyrosequenzierungen konnte jedoch nur ein Ergebnis generiert werden (1. 99%). In Zusammenschau der Befunde sind die Ergebnisse bei diesen beiden Patienten nicht sicher einzuordnen.

Bei den Patienten mit **ET** wurde die *JAK2* V617F Mutation bei einem von vier Patienten in den Mastzellen nachgewiesen. Bei dem Patienten ET2 konnten nicht genügend Zellen für die Mutationsanalysen isoliert werden. Zudem konnten bei den Patienten ET3 und ET4 aufgrund fehlender Amplifikate in der PCR keine Pyrosequenzierungen durchgeführt werden. Bei beiden Patienten ergaben die Schmelzpunktanalysen der mikrodisssektierten Mastzellen *JAK2 wt*.



**Abbildung 22:** *JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodisssektierten Mastzellen mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=20) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=17), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

#### 4.4.7 Mutationsanalysen an mikrodisektierten T-Lymphozyten

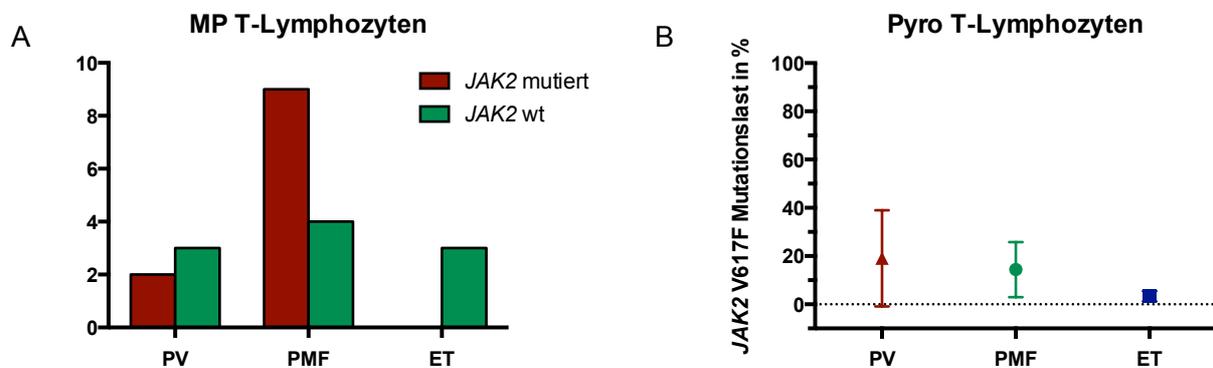
Der *JAK2* V617F Mutationsstatus der T-Lymphozyten hatte einen besonderen Stellenwert in dieser Arbeit. Im Gegensatz zu den bisher behandelten Zelllinien stammen die T-Lymphozyten nicht von einer myeloischen sondern von einer lymphatischen Progenitorzelle ab. Der Nachweis der *JAK2* V617F Mutation in den T-Lymphozyten würde auf die Akquisition der Mutation in einem sehr frühen hämatopoetischen Progenitorlevel sprechen. Um das Risiko einer Kontamination der mikrodisektierten T-Zellen insbesondere durch Zellen der (neutrophilen) Granulopoese zu vermeiden, führten wir eine immunhistochemische Doppelmarkierung CD3-positiver T-Lymphozyten und MPO-positiver neutrophiler Granulozyten durch. Insgesamt wurde die *JAK2* V617F Mutation bei sieben der 22 untersuchten MPN Patienten übereinstimmend in beiden Analyseverfahren – Schmelzpunktanalyse und Pyrosequenzierung - in den mikrodisektierten T-Lymphozyten detektiert. Bei zehn Patienten ergaben die Mutationsanalysen mikrodisektierter T-Lymphozyten übereinstimmend *JAK2 wt*. Bezogen auf die drei untersuchten Krankheitsentitäten zeigten sich folgende Ergebnisse für die Analyse von T-Zellen:

In der **PV**-Gruppe wurde die *JAK2* V617F Mutation bei einem von fünf Patienten nachgewiesen (PV1). Die korrespondierenden Pyrosequenzierungen ergaben analog zu den weiteren untersuchten Zelllinien bei diesem Patienten eine hohe *JAK2* V617F Allellast. Bei den Patienten PV2 bis PV4 wurden die T-Zellen als *JAK2 wt* gewertet. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierungen und Schmelzpunktanalysen des Patienten PV5 erbrachten vergleichbare Ergebnisse. In den Schmelzpunktanalysen stellten sich bei diesem Patienten in allen drei Schmelzkurvenauswertungen, neben einem prädominierenden *JAK2 wt* Signal, ein schwaches *JAK2* V617F Mutations-spezifisches Signal dar. Die korrespondierenden Pyrosequenzierungen ergaben eine niedrige Rate an *JAK2* V617 positiven Allelen von 14% ( $\neq$  *JAK2 wt*) welche, entsprechend des zuvor festgelegten *cut-offs* von 20% jedoch als nicht mutiert gewertet wurde.

Bei den Patienten mit **PMF** zeigten sich in neun von dreizehn Fällen übereinstimmende Mutationsbefunde zwischen Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen. Dabei wurden die T-Lymphozyten bei sechs von dreizehn Patienten übereinstimmend als *JAK2* V617F mutiert und bei den Patienten PMF4, PMF8 sowie PMF11 übereinstimmend als *JAK2 wt* gewertet. In drei Fällen unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Analyseverfahren voneinander (PMF3, PMF6, PMF10). In den Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF3 stellte sich in zwei von drei Schmelzkurven sowohl ein *JAK2 wt*-Peak als auch ein *JAK2* V617F Mutations-spezifischer Peak dar. In einer Schmelzkurve zeigte sich lediglich ein *JAK2 wt* Peak. In den entsprechenden Pyrosequenzierungen wurden die T-Zellen mit einer durchschnittlichen Rate *JAK2* V617F positiver Allele von 2% als *JAK2 wt*. Bei dem Patienten PMF6 zeigte sich in drei von drei Schmelzkurven neben einem *JAK2 wt* Peak, ein eindeutiges *JAK2* V617F Mutations-spezifisches Signal, einer heterozygoten *JAK2*-Mutation entsprechend. Die korrespondierenden Pyrosequenzierungen ergaben eine Rate im Codon 617

mutierter *JAK2* Allele von durchschnittlich 4% ( $\cong$  *JAK2 wt*). Analog hierzu ergaben die Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF10 eindeutig den Nachweis einer am ehesten heterozygoten *JAK2* Mutation. Die Pyrosequenzierungen bei diesem Patienten ergaben eine Rate mutierter *JAK2* Allele von 13% und wurden aufgrund des festgelegten *cut-offs* von 20% als nicht mutiert gewertet. Bei dem Patienten PMF12 konnten aufgrund fehlender PCR-Amplifikate keine Analysen mittels Pyrosequenzierungen durchgeführt werden. Die entsprechenden Schmelzpunktanalysen bei dem Patienten PMF12 ergaben *JAK2 wt*.

In der ET-Gruppe wurde die *JAK2* V617F Mutation übereinstimmend mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen bei keinem der vier Patienten in den T-Zellen nachgewiesen. In den Mutationsanalysen bei den Patienten ET1, ET3 sowie ET4 waren die T-Zellen eindeutig *JAK2 wt*. Bei dem Patienten ET2 konnten aufgrund einer zu geringen DNA-Menge keine Mutationsanalysen durchgeführt werden. Bei Patient ET3 lag, wie zuvor beschrieben, eine *CALR*-Mutation vor.



**Abbildung 23:** *JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodisssektierten T-Lymphozyten mittels (A) MP = Schmelzpunktanalysen (n=21) und (B) Pyro = Pyrosequenzierungen (n=20), Darstellung als Mittelwert mit SD; PV = Polyzythämia vera, PMF = Primäre Myelofibrose, ET = Essentielle Thrombozythämie

Entität	Patient	Gesamt DNA		Erythroblasten		Megakaryozyten		neutrophile G.		eosinophile G.		basophile G.		Mastzellen		T-Lymphozyten	
		MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro	MP	Pyro
PV	1	+	84	+	96	+	77	+	89	+	88	+	85	+	1	+	54
	2	+	81	+	84	+	54	+	81	+	73	+	n.a.	+	JAK2 wt	JAK2 wt	15
	3	+	77	+	n.a.	+	65	+	82	+	84	+	52	+	+	JAK2 wt	3
	4	+	n.a.	+	73	JAK2 wt	70	+	28	+	57	+	JAK2 wt	+	+	JAK2 wt	10
	5	+	29	+	51	+	12	+	34	+	25	+	JAK2 wt	n.a.	+	+	14
PMF	1	+	n.a.	+	53	+	37	+	60	+	42	+	44	+	+	+	26
	2	+	78	+	96	+	4	+	70	+	83	+	97	+	+	+	22
	3	+	62	+	89	+	73	+	67	+	62	+	51	+	+	+	2
	4	+	26	+	34	+	29	+	16	+	28	+	25	+	JAK2 wt	JAK2 wt	3
	5	n.a.	38	+	43	+	35	+	27	+	44	+	46	+	JAK2 wt	JAK2 wt	30
	6	+	42	+	35	+	68	+	56	+	n.a.	+	n.a.	+	+	+	4
	7	+	33	+	39	JAK2 wt	15	+	30	+	36	+	14	+	+	+	34
	8	+	n.a.	+	20	JAK2 wt	14	JAK2 wt	11	JAK2 wt	9	JAK2 wt	3	JAK2 wt	+	JAK2 wt	2
	9	+	80	+	75	+	40	+	80	+	77	+	77	+	+	+	23
	10	+	27	+	35	JAK2 wt	72	+	36	+	30	+	8	+	JAK2 wt	JAK2 wt	13
	11	+	13	+	27	+	23	+	14	+	14	+	25	+	JAK2 wt	JAK2 wt	7
	12	+	34	+	69	n.a.	94	+	24	JAK2 wt	54	JAK2 wt	36	+	+	JAK2 wt	n.a.
	13	+	26	+	34	+	35	+	34	+	26	+	34	+	+	+	+
ET	1	+	28	+	45	JAK2 wt	10	+	30	+	27	+	JAK2 wt	+	+	JAK2 wt	5
	2	+	30	+	36	+	18	+	30	+	25	+	24	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	3	JAK2 wt	n.a.	JAK2 wt	1	n.a.	n.a.	JAK2 wt	2	JAK2 wt	2	JAK2 wt	1	JAK2 wt	JAK2 wt	JAK2 wt	1
	4	+	21	+	37	JAK2 wt	36	+	24	+	8	+	n.a.	+	JAK2 wt	JAK2 wt	4

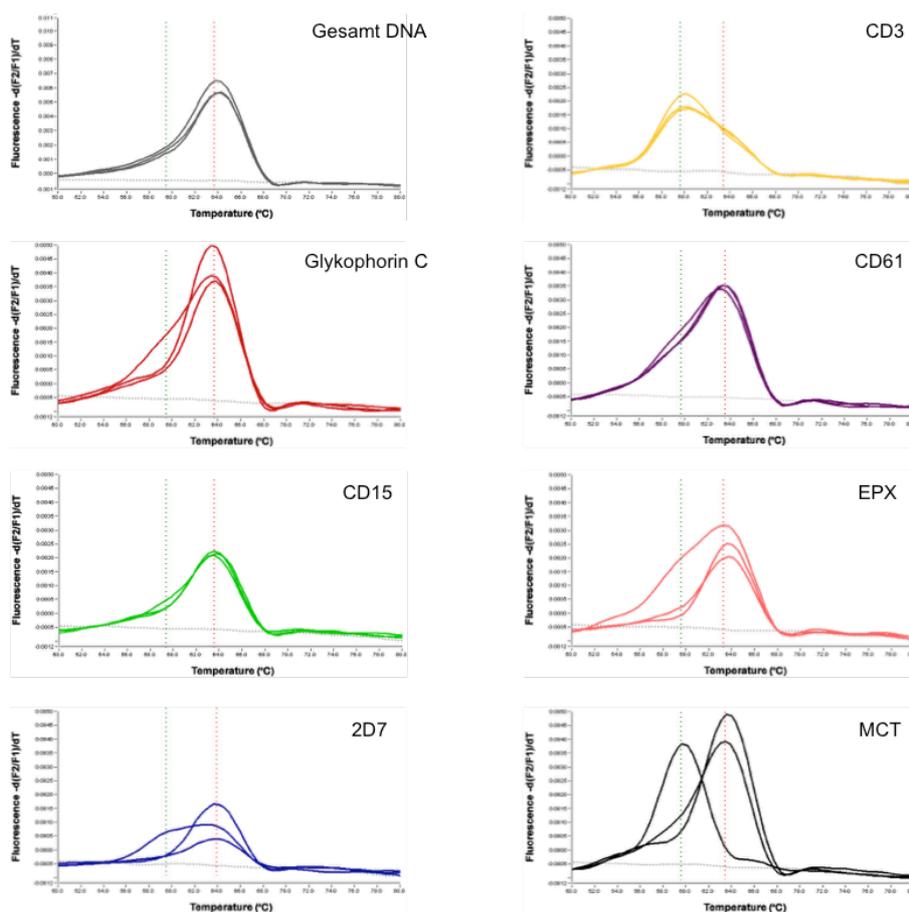
**Tabelle 16:** Übersicht aller Ergebnisse, MP = Schmelzpunktanalyse, Pyro = Pyrosequenzierung, + = Nachweis einer *JAK2* V617F Mutation, - = *JAK2 wt*, n.a. = Patienten-Proben, bei denen die DNA in dem jeweiligen Verfahren nicht amplifiziert und somit nicht analysiert werden konnte, G. = Granulozyten

#### 4.4.8 Der *JAK2* V617F Mutationsstatus bei Patienten mit PV

Die durchgeführten Mutationsanalysen an mikrodisssektierten Einzelzellen sowie an der Gesamt-DNA bei den fünf Patienten mit PV, ergaben im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Krankheitsentitäten höhere Raten an *JAK2* V617F mutierten Allelen. Eine Ausnahme stellte die Mastzellreihe dar. Hier wurden interessanterweise sehr niedrige Mutationsraten beobachtet.

Bei den Patienten PV1, PV2 und PV3 deutet die hohe Rate *JAK2* V617F positiver Allele sowie der Verlauf der entsprechenden Schmelzkurven, auf einen homozygoten *JAK2* V617F Mutation hin. Interessanterweise waren die Mast- sowie T-Zellen bei diesen Patienten nicht gleichermaßen von der Mutation betroffen (Siehe Tabelle 16). Bei dem Patienten PV2 z.B. wurden sowohl die Mastzellen als auch die T-Lymphozyten in beiden Analyseverfahren übereinstimmend als *JAK2* *wt* gewertet, obwohl alle anderen untersuchten Zelllinien eindeutig *JAK2* V617F positiv waren und sehr hohe Allellasten, entsprechend einer homozygoten Mutation aufwiesen.

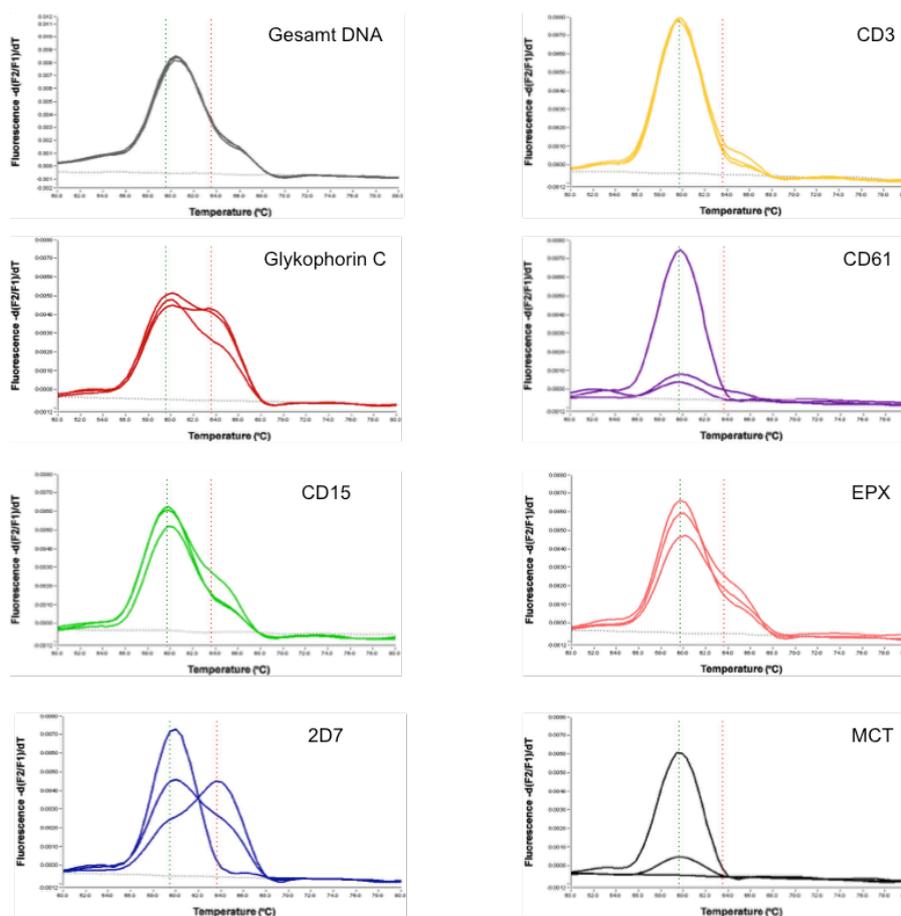
Die Schmelzkurven des Patienten PV1 sind exemplarisch in der Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24:** Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer a.e. homozygoten *JAK2* V617F Mutation des Patienten PV2. Die *JAK2* V617F Mutation besitzt eine Schmelzpunkttemperatur von ca.  $T_m = 63.5^\circ\text{C}$  (rote gestrichelte Linie). Die Schmelzpunkttemperatur der *JAK2* *wt* Sequenz liegt bei ca.  $T_m = 59.5^\circ\text{C}$  (grüne gestrichelte Linie). EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase

#### 4.4.9 Der *JAK2* V617F Mutationsstatus bei Patienten mit PMF

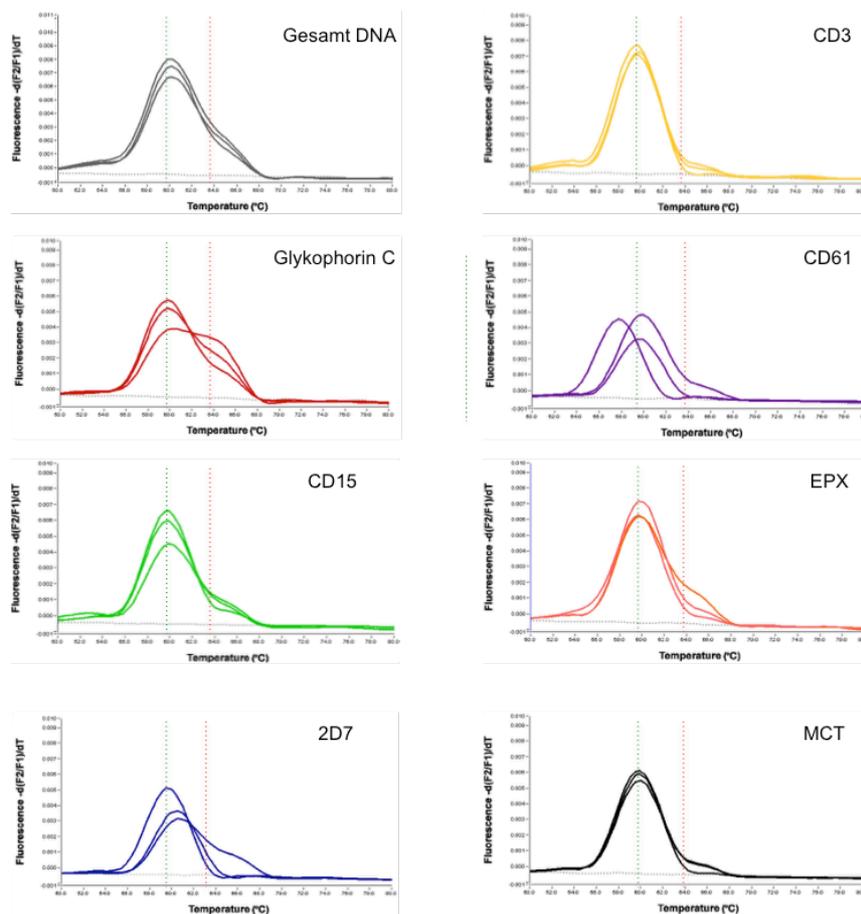
In der Gruppe der Patienten mit **PMF** konnte die *JAK2* V617F Mutation in allen untersuchten Zellreihen nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Rate im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele lag quantitativ zwischen der Rate *JAK2* positiver Allele bei den Patienten mit PV und derer bei den Patienten mit ET. Eine Ausnahme stellte hier erneut die Mastzellreihe dar. Die Mastzellen waren bei acht von dreizehn Patienten übereinstimmend in beiden Untersuchungsmethoden *JAK2* V617F mutiert. Die durch die Pyrosequenzierungen ermittelte Mutationsrate lag bei 45%. Innerhalb der PMF-Gruppe wurden die höchsten Raten mutierter *JAK2* Allele in den Erythroblasten gemessen. Beim Nachweis einer hohen *JAK2* V617F-Mutationslast in der Gesamt-DNA wurden bei den Mutationsanalysen an mikrodisezierten Einzelzellen myeloischer Zellreihen ebenfalls hohe Mutationsfrequenzen nachgewiesen. In den T-Zellen konnte die *JAK2* V617F Mutation bei fünf Patienten durch beide Analysetechniken übereinstimmend nachgewiesen werden (PMF2, PMF5, PMF7, PMF9, PMF13). Interessanterweise lag die Rate der ermittelten *JAK2* V617F Allelfrequenz bei diesen Patienten in den T-Zellen nur zwischen 20% und maximal 34%.



**Abbildung 25:** Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer heterozygoten *JAK2* V617F Mutation des Patienten PMF4. Die *JAK2* V617F Mutation besitzt eine Schmelzpunkttemperatur von ca.  $T_m = 63.5^\circ\text{C}$  (rote gestrichelte Linie). Die Schmelzpunkttemperatur der *JAK2* wt Sequenz liegt bei ca.  $T_m = 59.5^\circ\text{C}$  (grüne gestrichelte Linie). EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase

#### 4.4.10 Der *JAK2* V617F Mutationsstatus bei Patienten mit ET

Im Vergleich zu den beiden zuvor beschriebenen Krankheitsentitäten PV und PMF wurden bei den Patienten mit ET die niedrigsten Raten an *JAK2* V617F positiven Allelen beobachtet. Hierbei gilt zu beachten, dass sich diese Gruppe lediglich aus vier Patienten zusammensetzt. Bei keinem der Patienten mit ET wurden Allelfrequenzen >50% gemessen. Interessanterweise wurde die *JAK2* V617F Mutation bei dem Patienten ET1 nicht in den basophilen Granulozyten, Megakaryozyten und T-Zellen nachgewiesen, obwohl die anderen untersuchten Zelllinien (Erythroblasten, neutrophile / eosinophile Granulozyten, Mastzellen) offenbar Träger der Mutation waren. Bei dem Patienten ET3 wurde eine 52bp Deletion im *CALR*-Gen im Sinne einer Typ I Mutation (Klampfl, Gisslinger et al. 2013) nachgewiesen. Erwartungsgemäß zeigten die Analysen mikrodissektierter Zellen hier auch keine *JAK2* Mutation an.



**Abbildung 26:** Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer heterozygoten *JAK2* V617F Mutation des Patienten ET1. Die *JAK2* V617F Mutation besitzt eine Schmelzpunkttemperatur von ca.  $T_m = 63.5^\circ\text{C}$  (rote gestrichelte Linie). Die Schmelzpunkttemperatur der *JAK2* *wt* Sequenz liegt bei ca.  $T_m = 59.5^\circ\text{C}$  (grüne gestrichelte Linie); EPX = Eosinophilen Peroxidase, MCT = Mastzelltryptase.

## 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. In den *JAK2*-Mutationsanalysen an Gesamt-DNA aus Gewebeschnitten wurden in 16 von 17 auswertbaren Fällen übereinstimmende Ergebnisse mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen erzielt - 16x *JAK2* V617F. In einem Patienten konnte die *JAK2* V617F-Mutation unter Berücksichtigung der festgelegten *cut-offs* nur mittels Schmelzpunktanalyse detektiert werden.
2. Bei der Bestimmung der analytischen Sensitivität an mikrodisektierten Zellen wurde, bei angenommener homozygoter *JAK2* V617F Mutation gefunden, dass mindestens 10% mutierte Zellen erforderlich sind, damit sich, vor einem übermäßigen Hintergrund aus *JAK2 wt*-Zellen, ein signifikanter Mutationspeak in der Schmelzpunktanalyse darstellt. In den Pyrosequenzierungen konnte bereits ab 25 mikrodisektierten *JAK2* V617F positiven Zellen, ein Mutationssignal detektiert werden.
3. Bei der Analyse mikrodisektierter Zellen aus Patientenproben wurde die höchste *JAK2* V617F Allellast bei den Patienten mit PV beobachtet. Die niedrigsten Raten *JAK2* V617F positiver Allele wurden in der Gruppe der ET-Patienten gemessen.
4. Sowohl bei Patienten mit PV als auch bei Patienten mit PMF wurden sehr hohe Allellasten im Sinne homozygoter *JAK2* V617F Mutationen beobachtet. Demnach war keiner der untersuchten Patienten mit ET Träger einer homozygoten *JAK2* V617F Mutation.
5. Die Mastzellreihe nahm insofern eine besondere Stellung ein, als dass die höchsten Raten im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele bei den Patienten mit PMF und die niedrigsten Raten bei den Patienten mit PV gemessen wurde.
6. Bei sieben Patienten wurde die *JAK2* V617F Mutation übereinstimmend mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen in mikrodisektierten T-Lymphozyten nachgewiesen. Bei neun Patienten waren die T-Lymphozyten übereinstimmend mittels beider Analyseverfahren *JAK2 wt*, obwohl in weiteren untersuchten hämatopoetischen Zelllinien die *JAK2* V617F Mutation nachweisbar war.

## 5 Diskussion

---

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die drei myeloproliferativen Erkrankungsentitäten PV, PMF und ET in Bezug auf das Vorkommen der *JAK2* V617F Mutation und die Frequenz im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele in verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen untersucht. Hierzu wurden zum Teil eigens etablierte molekularpathologische Methoden eingesetzt, um in aufwendigen Analysen immunhistochemisch markierte mikrodissesezierte Zellen unterschiedlicher hämatopoetischer Linien auf das Vorkommen und die Frequenz der Mutation *JAK2* V617F zu untersuchen. Zahlreiche Studien legen nahe, dass die Anzahl der exprimierten mutierten *JAK2* Allele maßgeblich den Phänotyp der Erkrankung bestimmen (Levine, Wadleigh et al. 2005, Tefferi, Lasho et al. 2006, Dupont, Masse et al. 2007, Ohyashiki, Aota et al. 2007, Shide, Shimoda et al. 2008) und es sich bei den drei Erkrankungen um ein phänotypisches Kontinuum handelt (Campbell, Scott et al. 2005).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass erstens die *JAK2* V617F Mutation in allen untersuchten hämatopoetischen Zelllinien nachgewiesen werden kann (Erythroblasten, Megakaryozyten, neutrophile / eosinophile / basophile Granulozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten). Zweitens, dass sich die drei untersuchten Krankheitsentitäten anhand der Rate mutierter *JAK2* V617F Allele in den hämatopoetischen Zellen unterscheiden, z.B. wurden bei keinem der untersuchten ET-Patienten hohe *JAK2* V617F Mutationsraten detektiert. Die Unterschiede in der Höhe der *JAK2* V617F Mutationslast zwischen den drei Erkrankungsentitäten könnte zur differenzialdiagnostischen Einordnung einer Neoplasie beitragen. Drittens, dass die T-Lymphozyten in den meisten Fällen nicht Träger der *JAK2* V617F Mutation sind, die Mutation aber bei einigen Patienten definitiv auch in den T-Zellen gefunden werden kann, was auf die Mutation eines sehr frühen hämatopoetischen Progenitors hindeutet.

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### 5.1.1 Diskussion der morphologischen Befunde

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir Patientenmaterial in Form von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Knochenmarksstanzen hinsichtlich des Auftretens und der Allellast der *JAK2* V617F Mutation in den unterschiedlichen hämatopoetischen Zellreihen bei Patienten mit PV, PMF und ET. Einen besonderen Stellenwert hatte hier der Nachweis der *JAK2* V617F Mutation in den lymphatischen Zellen, speziell T-Lymphozyten, da diese nicht regelmäßig Träger der Mutation sind. So konnten Toyama, Karasawa et al. (2011) in ihrer Studie an 115 MPN-Patienten bei keinem Patienten die *JAK2* V617F Mutation in den T-Lymphozyten nachweisen.

Insgesamt wurden hier 22 Fälle typischerweise *JAK2* V617F-assoziiierter chronischer myeloproliferativer Neoplasien aus dem Archiv des pathologischen Instituts der Ludwigs-Maximilians-Universität München ausgewählt. Die Re-Evaluation der Knochenmarkshistologie, der

laborchemischen Parameter und der molekularpathologischen Befunde erfolgte unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Karl Sotlar und Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Horny. Hierbei wurden jeweils Fälle mit typischer Morphologie für die PV, PMF und ET ausgewählt. Nicht in allen Fällen waren Blutbild, klinische Befunde zu Organomegalien oder der Therapiestatus bekannt, sodass wir uns bewusst auf die morphologischen Befunde fokussiert haben.

Der Altersmedian (65.5 Jahre) des untersuchten Patientenkollektivs stimmt mit der aus der Literatur bekannten Altersverteilung bei den sogenannten BCR-ABL-negativen MPN überein.

In der Diagnostik und Differentialdiagnostik stellt der teilweise fließende Übergang der histomorphologischen Befunde bei der PV, PMF und ET unter Umständen eine große diagnostische Herausforderung dar. Von besonderer klinischer Bedeutung ist dabei die Abgrenzung der prognostisch günstigeren ET und PV einerseits von der prognostisch ungünstiger verlaufenden PMF andererseits.

### **5.1.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die möglichst eindeutige Identifikation einer bestimmten hämatopoetischen Zelllinie für die Mikrodissektion und für weitere molekulare Analysen wurden immunhistochemische Einzel- und Doppelmarkierungen durchgeführt. Auf diese Weise wurden Erythroblasten, Megakaryozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen mittels immunhistochemischer Einzelmarkierungen identifiziert. Für die Identifikation der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurde eine immunhistochemische CD3/MPO Doppelmarkierung verwendet. Durch die exemplarische Verwendung von MPO - die Etablierung von immunhistochemischen Doppelmarkierungen ist methodisch extrem aufwändig und konnte daher nicht auch für die anderen verwendeten Antikörper betrieben werden - in der immunhistochemischen Doppelmarkierung sollte der quantitativ häufigste Zelltyp des Knochenmarks, die neutrophile Granulopoese, zusätzlich markiert werden, um hierdurch eine mögliche Quelle einer Kontamination der mikrodisektierten T-Zell-Population möglichst gut identifizieren zu können. T-Zellen sind locker im Knochenmark zwischen den Zellen der Myelopoese verteilt und können im Gewebeschnitt auch anderen Zellen unmittelbar benachbart sein. Aufgrund dieser räumlichen Nähe kann es bei der Mikrodissektion vorkommen, dass außer der für die Mikrodissektion markierten Zelle auch die benachbarte Zelle durch den Laserimpuls mitgerissen wird. In einem solchen Fall kann es zu einer Kontamination des T-Zell-Ansatzes mit Zellen der myeloischen Reihen kommen, die eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für eine Beteiligung an dem *JAK2* V617F-positiven neoplastischen Klon besitzen. Vorangegangene Studien belegen, dass Granulozyten bei nahezu allen *JAK2* V617F positiven MPN Träger der *JAK2* V617F Mutation sind. In den letzten Jahren haben verschiedene Studien die Abwesenheit der *JAK2* V617F Mutation in den lymphatischen Zelllinien beschrieben und somit die These bekräftigt der maligne Zellklon stamme von einer myeloischen Progenitorzelle ab (Lasho, Mesa et al. 2005, Hussein, Brakensiek et al. 2006, Toyama, Karasawa et al. 2011). Dennoch konnten einzelne Arbeitsgruppen

wie z.B. Ishii, Bruno et al. (2006) oder Larsen, Christensen et al. (2007) die *JAK2* V617F Mutation in B- und T-Zellen detektieren was auf die Akquisition der Mutation auf einem früheren Progenitorlevel hindeuten würde. In diesem Zusammenhang zeigen unsere Ergebnisse an Verdünnungsreihen, dass ab einer Beimischung von 10% mutierter Allele (100 homozygot mutierte Zellen in einem Gemisch aus 1000 ansonsten wildtypischer Zellen) mit einem positiven Ergebnis in der Schmelzpunktanalyse gerechnet werden kann.

Des Weiteren gilt es nach Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe zu berücksichtigen, dass der immunhistochemische Marker 2D7 nicht absolut spezifisch für die basophilen Granulozyten ist, sondern auch durch Vorstufen der eosinophilen Granulopoese und in neoplastischen Mastzellen exprimiert sein kann.

### 5.1.3 Methodenvergleich

Der Fokus dieser Promotionsarbeit lag auf dem Nachweis der *JAK2* V617F Mutation in, per Lasermikrodissektion angereicherten, Einzelzellen unterschiedlicher hämatopoetischer Zelllinien bei Patienten mit PV, ET und PMF. Das vergleichende Screening auf die *JAK2* V617F Mutation erfolgte mittels zweier unterschiedlicher Verfahren, der Schmelzpunktanalyse und der Pyrosequenzierung. Beide Verfahren waren bereits im Pathologischen Institut der LMU-München, zumindest für die Analyse von Gesamt-DNA aus Gewebeschnitten, etabliert. Durch den Einsatz zweier unabhängiger Analyseverfahren sollte die Validität der Ergebnisse erhöht werden.

Bei der Analyse mikrodissektierter Zellen war die Qualität und/oder Quantität der DNA teilweise aufgrund der Formalin-Fixierungen und EDTA Entkalkungen nicht mehr ausreichend um ein Amplifikat in der PCR zu generieren. Vorausgegangene Studien unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass, in Abhängigkeit der Materialqualität, mindestens 100 bis 250 mikrodissektierte Zellkerne nötig sind um mit hoher Sicherheit (>80%) ein Amplikon zu generieren, mit dem dann anschließend weitere Mutationsanalysen durchgeführt werden können. Die Mastzellen und basophilen Granulozyten kamen nur in einer geringen Anzahl in den Knochenmarksschnitten vor, was zu einer eingeschränkten Ausbeute in der Amplifikation dieser Zellreihen nach der Mikrodissektion geführt hatte. Auch Qualitätsunterschiede zwischen den untersuchten Patientenproben wurden beobachtet. Dies ist zum Teil durch die unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte der Knochenmarksstanzen bedingt - die älteste Probe wurde bereits 2004 entnommen, die jüngste Probe im Jahr 2012. Ein großer Vorteil der Schmelzpunktanalysen war es, dass bereits sehr geringe DNA-Mengen für die PCR-Amplifikationen und anschließenden Mutationsanalysen ausreichten. Im Vergleich zu den Pyrosequenzierungen konnten nur in vier Fällen keine Ergebnisse generiert werden. In den Pyrosequenzierungen waren es dagegen 15 Fälle.

Die Isolierung der immunhistochemisch markierten Zellen erfolgte mittels *Laser Pressure Catapulting*. Die Methode ermöglicht die Analyse hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark,

die normalerweise für derartige Untersuchungen nicht zugänglich sind (Hussein, Brakensiek et al. 2007). Bei der Beurteilung der Ergebnisse der mikrodisektierten Megakaryozyten gilt es zu beachten, dass aufgrund der Größe der Zellkerne höhere Laserenergien als bei den anderen untersuchten Zellreihen benötigt wurden. Diese höheren Energien könnten die DNA-Qualität negativ beeinflusst haben.

Die Auswahl der Zellen, einer hämatopoetischen Linie, erfolgte zufällig. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei den *JAK2* V617F positiven MPN, *JAK2* V617F mutierte transformierte Zellklone neben *JAK2* wt Zellen vorkommen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Sequenzierungen der Patientenproben die Anzahl der *JAK2* V617F-Träger unterschätzen; z.B. kann eine heterozygote Mutation nur durch eine Sequenzierung detektiert werden, wenn die Mutation in > 40% der Zellen (entspricht > 20% mutierte Allele) vorhanden ist (Baxter, Scott et al. 2005).

Die Pyrosequenzierungen ermöglichten es im Gegensatz zu den Schmelzpunktanalysen die im Codon 617 mutierten *JAK2* Allele zu quantifizieren. Hierbei gilt es zu beachten, dass wir die Untersuchungen an DNA und nicht an cDNA durchführten. Somit kann keine Aussage über die Anzahl der tatsächlich exprimierten *JAK2* V617F Allele getroffen werden. Die Isolierung von RNA zur cDNA-Synthese aus Parafinmaterial ist technisch schwierig. Um die Spezifität der Pyrosequenzierung zu erhöhen, legten wir die Nachweisgrenze, ab der ein Fall als *JAK2* V617F mutiert gewertet wurde, auf >20% fest. Bei den durchgeführten Untersuchungen war es wichtig eine potenzielle Kontamination durch umliegendes Gewebe mit einzuberechnen. Die Nachweisgrenze ist im Vergleich zu der von Hussein, Brakensiek et al. (2007) bei der Mikrodisektion von Megakaryozyten verwendeten 5% Nachweisgrenze sicherheitshalber ziemlich hoch gewählt.

Darüberhinaus war ein Nachteil der Pyrosequenzierungen ein höherer Zeitaufwand als bei der Schmelzpunktanalyse.

## **5.2 Die Bedeutung des *JAK2* Mutationsstatus bei den MPN**

Die *JAK2* V617F Mutation hat seit ihrer Erstbeschreibung im Jahr 2005 einen besonderen Stellenwert im Rahmen der Diagnostik myeloproliferativer Neoplasien eingenommen. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass über 95% der Patienten mit PV und ca. 50-60% der Patienten mit PMF oder ET, Träger der *JAK2* V617F Mutation sind. Bei weniger als 10% der MPN Patienten, ist weder eine Mutation im *JAK2*- noch im *MPL*- oder *CALR*-Gen nachweisbar. In der vorliegenden Studie unterschieden sich die drei Krankheitsentitäten hinsichtlich der Frequenz im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele. Dies stimmt mit den von Campbell, Scott et al. (2005) beschriebenen Beobachtungen überein, die MPN seien keine eigenständigen Krankheitsbilder sondern ein phänotypisches Kontinuum, bei dem der *JAK2* V617F Mutationsstatus die Erkrankungsentitäten moduliert. In den letzten Jahren rückt zudem zunehmend die Annahme in den Vordergrund, dass weitere somatische teilweise noch unbekannt Mutationen sowie

Alterationen und Mutationen im *microenvironment* einen Einfluss auf den Erkrankungsphänotyp haben (Walkley, Olsen et al. 2007, Bacher, Haferlach et al. 2010).

### 5.2.1 Die *JAK2 V617F* Mutation bei den Patienten mit PV

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien, beobachteten wir die höchsten Raten mutierter *JAK2* Allelen bei den Patienten mit PV. Die durch die Pyrosequenzierungen ermittelte *JAK2 V617F* Allellast lag bei vier von fünf PV-Patienten über 50%. In Zusammenschau mit den dazugehörigen Schmelzkurven handelt es sich bei diesen Patienten am ehesten um Träger einer homozygoten *JAK2 V617F* Mutation. Interessanterweise waren nicht alle Zelllinien gleichermaßen von der Mutation betroffen, das heißt nicht in allen Zellreihen wurden hohe *JAK2 V617F* Mutationsfrequenzen gemessen. Auch in einer Studie von Hussein, Brakensiek et al. (2007) konnte die Transition der Heterozygotie zur Homozygotie nicht in allen myeloischen Zellreihen gleichermaßen nachgewiesen werden. Moliterno, Williams et al. (2008) untersuchten den Zusammenhang zwischen der *JAK2 V617F* Mutationslast und dem phänotypischen Bild der MPN. Sie bestimmten die *JAK2 V617F* Allelfrequenz in der genomischen DNA der neutrophilen Granulozyten, der CD34+ Zellen und des Subklons d.h. der daraus hervorgehenden Zellpopulation und korrelierten die Ergebnisse mit der Erkrankungsentität und den klinischen Parametern. Die Untersuchungen ergaben, dass die Mutationsfrequenz bei der PV und ET in den CD34+ Zellen niedriger war als in den neutrophilen Granulozyten. Dies könnte durch eine Zunahme der *JAK2 V617F* Allellast während der Differenzierung der Progenitorzellen zu reifen hämatopoetischen Zellen, z.B. durch mitotische Rekombination und/oder durch einen Überlebensvorteil der transformierten Zellklone bedingt sein. In der vorliegenden Arbeit wurden bei den Patienten mit PV in den Mastzellen geringere Raten an *JAK2 V617F* positiven Allelen gemessen als in den anderen Abkömmlingen der myeloischen Stammzelle. In Zusammenschau mit einer ebenfalls niedrigen Mutationslast in den lymphatischen Zellen bei vier der Untersuchten PV Patienten, könnte dies dadurch bedingt sein, dass die Mutation zu einem Zeitpunkt entsteht an dem sich zum einen die lymphatische Zellreihe aber auch die Mastzellreihe von einem gemeinsamen Progenitor abgespalten haben.

Interessanterweise wurde die *JAK2 V617F* Mutation bei dem Patienten PV1 auch in den T-Zellen mit einer hohen Allellast nachgewiesen. Im Einklang hierzu wurden in den myeloischen Zelllinien die Mastzellreihe ausgenommen ebenfalls hohe Mutationsraten detektiert. Larsen, Christensen et al. (2007) haben in ihrer Studie ähnliche Beobachtungen bei je einem Patienten mit PV und mit PMF gemacht. Bei beiden Patienten wurden in der *real time quantitative* PCR sehr hohe *JAK2 V617F* Mutationsfrequenzen (Patient mit PV 65%, Patient mit PMF 83%), einer homozygoten Mutation entsprechend, in den T-Zellen gemessen. Analog zu unseren Daten waren die weiteren untersuchten myeloischen Zelllinien gleichermaßen *JAK2 V617F* homozygot. Die *JAK2 V617F* Mutationslast in den Mastzellen könnte durch die geringe Anzahl an für die Mikrodissektion zur Verfügung stehenden

Mastzellen in den Knochenmarksschnitten und der damit verbundenen geringen DNA-Menge unterschätzt werden.

In einer weiteren Studie korrelierten Koren-Michowitz, Landman et al. (2012) die Transformation einer PV in eine post-PV-MF mit einer hohen *JAK2* V617F Mutationslast. Hussein, Bock et al. (2009) wiesen ebenfalls einen signifikanten Anstieg der *JAK2* V617F Allellast bei einigen Patienten mit PV, bei Übergang in eine Polyglobulie oder in eine Post-ET-PV nach, die sich zunächst als rein thrombozytische MPN präsentierten. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich histologisch lediglich bei einem PV-Patient eine Myelofibrose ersten Grades. Die gemessene *JAK2* V617F Mutationslast bei diesem Patienten war jedoch nicht höher als bei den Patienten ohne Myelofibrose.

### **5.2.2 Die *JAK2* V617F Mutation bei den Patienten mit PMF**

Bei den Patienten mit PMF lagen die ermittelten Raten *JAK2* V617F positiver Allele, zwischen der Mutationslast bei den Patienten mit PV und der bei den Patienten mit ET. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen waren in dieser Gruppe, ausgenommen der lymphatischen Zellreihe, homogen verteilt. Im Gegensatz zu den Patienten mit PV wurden bei Nachweis einer hohen Mutationslast in der Gesamt-DNA auch hohe Raten im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele in den Mastzellen detektiert.

Ein Patient mit PMF wies histologisch eine Myelofibrose zweiten bis dritten Grades auf. Hussein, Bock et al. (2007) zeigten in ihrer Studie, dass bei der Mehrheit der Patienten mit PMF in einem fibrotischen Stadium die Megakaryozyten *JAK2* V617F homozygot sind. Die Pyrosequenzierung ergab bei unserem Patienten allerdings lediglich eine Rate mutierter *JAK2*-Allele von 37% in den mikrodissektierten Megakaryozyten. Interessanterweise wurde die höchste *JAK2* V617F Mutationslast (>50%) bei diesem Patienten in den Mastzellen gefolgt von den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten detektiert. In der Gruppe der Patienten mit PMF wurde bei insgesamt sechs der dreizehn untersuchten Patienten die *JAK2* V617F Mutation in den T-Zellen nachgewiesen.

### **5.2.3 Die *JAK2* V617F Mutation bei den Patienten mit ET**

Die untersuchten Patienten mit ET wiesen sowohl in den Analysen an extrahierter Gesamt-DNA als auch in den mikrodissektierten hämatopoetischen Zellreihen die niedrigsten Raten an mutierten *JAK2* V617F Allelen auf. Die Ergebnisse stimmen mit den von Hussein, Brakensiek et al. (2007) durchgeführten Studien überein, die eine signifikant geringere *JAK2* V617F Allellast bei Patienten mit ET im Vergleich zu Patienten mit PMF in einem fibrotischen Stadium sowie zu Patienten mit PV nachwies. Die Mutationslast bei den Patienten mit PMF in einer präfibrotischen Phase waren in der Studie mit der *JAK2* V617F Allellast der ET Gruppe vergleichbar und analog zur ET *JAK2* V617F heterozygot (Hussein, Brakensiek et al. 2007). In unserer Studie lagen die Raten im Codon 617 mutierter *JAK2*-Allele bei den vier untersuchten ET-Patienten jeweils <50%. In Zusammenschau mit

dem Schmelzkurvenverlauf war keiner dieser Patienten *JAK2* V617F homozygot. Vorrausgegangene Studien suggerieren, dass die geringe Frequenz homozygoter *JAK2* V617F Mutationen bei den Patienten mit ET vermutlich auf eine niedrige mitotische Aktivität mutierter ET-Progenitorzellen zurückzuführen ist (Kralovics, Passamonti et al. 2005). Interessanterweise war die gemessene Mutationslast in den Megakaryozyten nicht höher als in den anderen untersuchten Zellreihen. Bei keinem der untersuchten Patienten mit ET wurde die *JAK2* V617F Mutation in den T-Zellen detektiert.

#### **5.2.4 Korrelation des Mutationsstatus mit den laborchemischen Parametern**

Der *JAK2* V617F Mutationsstatus bzw. die Frequenz mutierter *JAK2*-Allele bestimmen maßgeblich den klinischen Verlauf der PV, ET und PMF und damit auch das Spektrum möglicher Komplikationen. Bei Trägern einer homozygoten *JAK2* V617F-Mutation wurden in einer Studie von Vannucchi, Antonioli et al. (2007) höhere Raten an thrombembolischen Ereignissen und Myelofibrosen sowie ein erhöhter Bedarf an zytoreduktiven Therapien beobachtet. Zudem konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass PV-Patienten mit einer *JAK2* V617F Allellast >75% einen schwereren Krankheitsverlauf haben, als Patienten mit einer Allellast <25%.

Kondo, Okuno et al. (2008) evaluierten die klinische Bedeutung des *JAK2* Mutationsstaus indem sie den Zusammenhang zwischen der *JAK2* V617F Mutationslast und den klinischen und laborchemischen Parametern untersuchten. Bei Patienten mit einer hohen *JAK2* V617F Allellast wurden signifikant höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte sowie niedrigere Thrombozytenwerte beobachtet als bei Patienten mit einer mittleren Mutationslast. Es zeigte sich zudem eine negative Korrelation der Thrombozytenwerte mit der *JAK2* V617F Allellast. Im Einklang hierzu konnten Vannucchi, Antonioli et al. (2007) eine lineare Beziehung zwischen der *JAK2* V617F Allellast und dem Hämoglobinwert beobachten. In einer Studie von Tefferi, Strand et al. (2007) konnte dies nicht bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe beobachtete hingegen eine lineare Korrelation zwischen der *JAK2* V617F Allellast und den Leukozytenzahlen, allerdings nicht mit der Höhe des Hämoglobinwerts oder der Thrombozytenzahlen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen unserer Studie überein. Wir beobachteten bei den Patienten mit hoher *JAK2* V617F Allellast ebenfalls hohe Leukozytenwerte. Die Patienten mit mittlerer *JAK2* V617F Mutationslast wiesen die höchsten Hämoglobinwerte auf. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und Daten aus der Literatur scheint eine niedrige *JAK2* V617F Mutationslast die Thrombopoese, eine mittlere *JAK2* V617F Mutationslast die Erythropoese und eine hohe *JAK2* V617F Mutationslast die Myelopoese zu stimulieren.

In dieser Studie wurden sowohl die Gesamt-DNA als auch die weiteren untersuchten Zelllinien bei einem Patienten mit ET als *JAK2 wt* gewertet. Bei einem PMF Patienten wurde die *JAK2* V617F Mutation lediglich in den Schmelzpunktanalysen an Gesamt-DNA sowie durch beide

Analyseverfahren in den Erythroblasten nachgewiesen, alle weiteren untersuchten Zelllinien waren *JAK2 wt*. Zur weiteren Beurteilung des Mutationsstatus dieser Patienten wurden ergänzend *CALR*- und *MPL*-Mutationsanalysen durchgeführt. Keine der beiden Mutationen konnte bei dem Patienten mit PMF nachgewiesen werden. Der Patient ET3 wies eine Typ I *CALR*-Mutation (52bp Deletion im Exon 9 des *CALR*-Gens) auf. Laborchemisch zeigte sich bei diesem Patienten, in Übereinstimmung mit der Literatur, eine massive Thrombozytose, eine Anämie sowie eine moderate Leukozytose (Klampfl, Gisslinger et al. 2013, Rotunno, Mannarelli et al. 2014). In der Literatur wird beschrieben, dass bei der *CALR* positiven ET im Gegensatz zu den *JAK2 V617F* positiven ET keine Transformationen in eine post-ET-PV beobachtet werden. Das Risiko einer Thrombose ist bei der *JAK2 V617F* positiven ET doppelt so hoch wie bei der *CALR* positiven ET. In Bezug auf den Übergang in eine post-ET-MF zeigen sich keine Unterschiede (Rumi, Pietra et al. 2013).

## 6 Zusammenfassung

---

Die *JAK2* V617F Mutation ist die häufigste molekulare Aberration bei den Philadelphia Chromosom negativen myeloproliferativen Neoplasien. Es handelt es sich um eine dominante *Gain-of-function* Mutation die eine konstitutive Aktivierung der JAK-STAT Signalkaskade bedingt (Kralovics, Passamonti et al. 2005). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mutation bei ca. 95% der Patienten mit PV und bei jeweils 50-60% der Patienten mit ET und PMF nachweisbar ist (Campbell and Green 2006). Die Frage wie dieselbe Mutation zu drei phänotypisch unterschiedlichen Erkrankungen mit abweichenden Prognosen führen kann ist jedoch weiterhin nicht abschließend geklärt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit führten wir *JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodisezierten hämatopoetischen Zellen aus Knochenmarkstrepanaten bei Patienten mit PV, PMF und ET mittels Schmelzpunktanalysen und Pyrosequenzierungen durch. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus fünf Patienten mit PV, dreizehn Patienten mit PMF und vier Patienten mit ET. Folgende Zelllinien wurden hinsichtlich des Auftretens und der Frequenz im Codon 617 mutierter *JAK2*-Alle untersucht: Erythroblasten, Megakaryozyten, eosinophile / basophile / neutrophile Granulozyten, Mastzellen und T-Lymphozyten. Ein besonderes Augenmerk lag auf dem Mutationsstatus der T-Zellen, da diese laut Literatur zumeist nicht Träger der *JAK2* V617F Mutation sind.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es reproduzierbar die *JAK2* V617F Mutation in mikrodisezierten Zellen aller untersuchter hämatopoetischer Linien nachzuweisen. Bezogen auf die zugrundeliegenden Entitäten fand sich die höchste Frequenz im Codon 617 mutierter *JAK2* Allele bei den Patienten mit PV gefolgt von den Patienten mit PMF. Bei den Patienten mit ET wurden durchgehend niedrige Mutationslasten detektiert. Darüberhinaus war keiner der untersuchten ET-Patienten Träger einer homozygoten *JAK2* V617F Mutation.

In den T-Lymphozyten wurde die *JAK2* V617F Mutation bei insgesamt sieben Patienten übereinstimmend in beiden Analysetechniken nachgewiesen, darunter sechs Patienten mit PMF und ein Patient mit PV. Diese Beobachtung deutet auf die Akquisition der Mutation auf einem sehr frühen Progenitorlevel hin.

In Zusammenschau aller Befunde und der Literatur unterstützen unsere Ergebnisse die Theorie, dass es sich bei der PV, PMF und ET um ein phänotypisches Kontinuum handeln kann, bei dem die *JAK2* V617F Mutationslast weitere somatische Mutationen sowie das *microenvironment* den Phänotyp der Erkrankung bestimmen. Eine hohe *JAK2* V617F Allellast schließt eine ET praktisch aus. Die Bestimmung der *JAK2* V617F Allellast könnte bei der Entscheidung behilflich sein die ungünstigere PMF oder PV von der günstigeren ET abzugrenzen.

Unsere Ergebnisse unterstreichen darüberhinaus die Annahme, dass der neoplastische Zellklon zu unterschiedlichen Zeitpunkten der hämatopoetischen Differenzierung entstehen kann und somit die *JAK2* V617F Mutation auch in Zellen der lymphatischen Reihe detektiert werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

(1995). "Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia." Ann Intern Med **123**(9): 656-664.

Aaronson, D. S. and C. M. Horvath (2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT." Science **296**(5573): 1653-1655.

Abdel-Wahab, O., T. Manshouri, J. Patel, K. Harris, J. Yao, C. Hedvat, A. Heguy, C. Bueso-Ramos, H. Kantarjian, R. L. Levine and S. Verstovsek (2010). "Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias." Cancer Res **70**(2): 447-452.

Abdel-Wahab, O., A. Mullally, C. Hedvat, G. Garcia-Manero, J. Patel, M. Wadleigh, S. Malinge, J. Yao, O. Kilpivaara, R. Bhat, K. Huberman, S. Thomas, I. Dolgalev, A. Heguy, E. Paietta, M. M. Le Beau, M. Beran, M. S. Tallman, B. L. Ebert, H. M. Kantarjian, R. M. Stone, D. G. Gilliland, J. D. Crispino and R. L. Levine (2009). "Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies." Blood **114**(1): 144-147.

Abdel-Wahab, O., A. Pardanani, J. Patel, M. Wadleigh, T. Lasho, A. Heguy, M. Beran, D. G. Gilliland, R. L. Levine and A. Tefferi (2011). "Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms." Leukemia **25**(7): 1200-1202.

Abdel-Wahab, O., A. Pardanani, R. Rampal, T. L. Lasho, R. L. Levine and A. Tefferi (2011). "DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms." Leukemia **25**(7): 1219-1220.

Antonioli, E., P. Guglielmelli, A. Pancrazzi, C. Bogani, M. Verrucci, V. Ponziani, G. Longo, A. Bosi and A. M. Vannucchi (2005). "Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia." Leukemia **19**(10): 1847-1849.

Araki, T., M. G. Mohi, F. A. Ismat, R. T. Bronson, I. R. Williams, J. L. Kutok, W. Yang, L. I. Pao, D. G. Gilliland, J. A. Epstein and B. G. Neel (2004). "Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation." Nat Med **10**(8): 849-857.

Axelrad, A. A., D. Eskinazi, P. N. Correa and D. Amato (2000). "Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia." Blood **96**(10): 3310-3321.

Bacher, U., C. Haferlach, S. Schnittger, A. Kohlmann, W. Kern and T. Haferlach (2010). "Mutations of the TET2 and CBL genes: novel molecular markers in myeloid malignancies." Ann Hematol **89**(7): 643-652.

Baxter, E. J., L. M. Scott, P. J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G. S. Vassiliou, A. J. Bench, E. M. Boyd, N. Curtin, M. A. Scott, W. N. Erber, A. R. Green and P. Cancer Genome (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." Lancet **365**(9464): 1054-1061.

Beer, P. A., P. J. Campbell, L. M. Scott, A. J. Bench, W. N. Erber, D. Bareford, B. S. Wilkins, J. T. Reilly, H. C. Hasselbalch, R. Bowman, K. Wheatley, G. Buck, C. N. Harrison and A. R. Green (2008). "MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort." Blood **112**(1): 141-149.

Beer, P. A., A. V. Jones, A. J. Bench, A. Goday-Fernandez, E. M. Boyd, K. J. Vaghela, W. N. Erber, B. Odeh, C. Wright, M. F. McMullin, J. Cullis, B. J. Huntly, C. N. Harrison, N. C. Cross and A. R. Green (2009). "Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones." Br J Haematol **144**(6): 904-908.

Bock, O., M. Muth, K. Theophile, M. Winter, K. Hussein, G. Busche, N. Kroger and H. Kreipe (2009). "Identification of new target molecules PTK2, TGFBR2 and CD9 overexpressed during advanced bone marrow remodelling in primary myelofibrosis." Br J Haematol **146**(5): 510-520.

Campbell, P. J. and A. R. Green (2006). "The myeloproliferative disorders." N Engl J Med **355**(23): 2452-2466.

Campbell, P. J., M. Griesshammer, K. Dohner, H. Dohner, R. Kusec, H. C. Hasselbalch, T. S. Larsen, N. Pallisgaard, S. Giraudier, M. C. Le Bousse-Kerdiles, C. Desterke, B. Guerton, B. Dupriez, D. Bordessoule, P. Fenaux, J. J. Kiladjian, J. F. Viallard, J. Briere, C. N. Harrison, A. R. Green and J. T. Reilly (2006). "V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis." Blood **107**(5): 2098-2100.

Campbell, P. J., L. M. Scott, G. Buck, K. Wheatley, C. L. East, J. T. Marsden, A. Duffy, E. M. Boyd, A. J. Bench, M. A. Scott, G. S. Vassiliou, D. W. Milligan, S. R. Smith, W. N. Erber, D. Bareford, B. S. Wilkins, J. T. Reilly, C. N. Harrison, A. R. Green, G. United Kingdom Myeloproliferative Disorders Study, P. Medical Research Council Adult Leukaemia Working, L. Australasian and G. Lymphoma (2005). "Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study." Lancet **366**(9501): 1945-1953.

Carbuccia, N., A. Murati, V. Trouplin, M. Brecqueville, J. Adelaide, J. Rey, W. Vainchenker, O. A. Bernard, M. Chaffanet, N. Vey, D. Birnbaum and M. J. Mozziconacci (2009). "Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms." Leukemia **23**(11): 2183-2186.

Cassinat, B., E. Verger and J. J. Kiladjian (2014). "Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia." N Engl J Med **371**(2): 188-189.

Cervantes, F., B. Dupriez, A. Pereira, F. Passamonti, J. T. Reilly, E. Morra, A. M. Vannucchi, R. A. Mesa, J. L. Demory, G. Barosi, E. Rumi and A. Tefferi (2009). "New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment." Blood **113**(13): 2895-2901.

Chan, I. T., J. L. Kutok, I. R. Williams, S. Cohen, L. Kelly, H. Shigematsu, L. Johnson, K. Akashi, D. A. Tuveson, T. Jacks and D. G. Gilliland (2004). "Conditional expression of oncogenic K-ras from its endogenous promoter induces a myeloproliferative disease." J Clin Invest **113**(4): 528-538.

Cheung, B., D. Radia, P. Pantelidis, G. Yadegarfar and C. Harrison (2006). "The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essential thrombocythaemia." *Br J Haematol* **132**(2): 244-245.

Crisa, E., E. Venturino, R. Passera, M. Prina, P. Schinco, A. Borchiellini, V. Giai, M. A. Ciocca Vasino, M. Bazzan, A. Vaccarino, M. Boccadoro and D. Ferrero (2010). "A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs." *Ann Hematol* **89**(7): 691-699.

Dai, C. H., S. B. Krantz, E. N. Dessypris, R. T. Means, Jr., S. T. Horn and H. S. Gilbert (1992). "Polycythemia vera. II. Hypersensitivity of bone marrow erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocyte progenitor cells to interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **80**(4): 891-899.

David, M., H. E. Chen, S. Goelz, A. C. Larner and B. G. Neel (1995). "Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1." *Mol Cell Biol* **15**(12): 7050-7058.

Decker, T., D. J. Lew, J. Mirkovitch and J. E. Darnell, Jr. (1991). "Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor." *EMBO J* **10**(4): 927-932.

Delhommeau, F., S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Masse, O. Kosmider, J. P. Le Couedic, F. Robert, A. Alberdi, Y. Lecluse, I. Plo, F. J. Dreyfus, C. Marzac, N. Casadevall, C. Lacombe, S. P. Romana, P. Dessen, J. Soulier, F. Viguie, M. Fontenay, W. Vainchenker and O. A. Bernard (2009). "Mutation in TET2 in myeloid cancers." *N Engl J Med* **360**(22): 2289-2301.

Delhommeau, F., S. Dupont, C. Tonetti, A. Masse, I. Godin, J. P. Le Couedic, N. Debili, P. Saulnier, N. Casadevall, W. Vainchenker and S. Giraudier (2007). "Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis." *Blood* **109**(1): 71-77.

DGHO, D. G. f. H. u. M. O. (2014). "Polycythaemia Vera (PV) — DGHO."

Dupont, S., A. Masse, C. James, I. Teyssandier, Y. Lecluse, F. Larbret, V. Ugo, P. Saulnier, S. Koscielny, J. P. Le Couedic, N. Casadevall, W. Vainchenker and F. Delhommeau (2007). "The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera." *Blood* **110**(3): 1013-1021.

el-Kassar, N., G. Hetet, J. Briere and B. Grandchamp (1997). "Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets." *Blood* **89**(1): 128-134.

Ernst, T., A. J. Chase, J. Score, C. E. Hidalgo-Curtis, C. Bryant, A. V. Jones, K. Waghorn, K. Zoi, F. M. Ross, A. Reiter, A. Hochhaus, H. G. Drexler, A. Duncombe, F. Cervantes, D. Oscier, J. Boulwood, F. H. Grand and N. C. Cross (2010). "Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders." *Nat Genet* **42**(8): 722-726.

- Feng, J., B. A. Witthuhn, T. Matsuda, F. Kohlhuber, I. M. Kerr and J. N. Ihle (1997). "Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop." Mol Cell Biol **17**(5): 2497-2501.
- Figueroa, M. E., O. Abdel-Wahab, C. Lu, P. S. Ward, J. Patel, A. Shih, Y. Li, N. Bhagwat, A. Vasanthakumar, H. F. Fernandez, M. S. Tallman, Z. Sun, K. Wolniak, J. K. Peeters, W. Liu, S. E. Choe, V. R. Fantin, E. Paietta, B. Lowenberg, J. D. Licht, L. A. Godley, R. Delwel, P. J. Valk, C. B. Thompson, R. L. Levine and A. Melnick (2010). "Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation." Cancer Cell **18**(6): 553-567.
- Gelsi-Boyer, V., V. Trouplin, J. Adelaide, J. Bonansea, N. Cervera, N. Carbucciona, A. Lagarde, T. Prebet, M. Nezri, D. Sainty, S. Olschwang, L. Xerri, M. Chaffanet, M. J. Mozziconacci, N. Vey and D. Birnbaum (2009). "Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia." Br J Haematol **145**(6): 788-800.
- Goldwasser, E., N. Beru and D. Smith (1990). "Erythropoietin." Immunol Ser **49**: 257-276.
- Gross, S., R. A. Cairns, M. D. Minden, E. M. Driggers, M. A. Bittinger, H. G. Jang, M. Sasaki, S. Jin, D. P. Schenkein, S. M. Su, L. Dang, V. R. Fantin and T. W. Mak (2010). "Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations." J Exp Med **207**(2): 339-344.
- Guglielmelli, P., A. Pancrazzi, G. Bergamaschi, V. Rosti, L. Villani, E. Antonioli, A. Bosi, G. Barosi, A. M. Vannucchi, G. I.-I. R. o. Myelofibrosis and M. P. D. R. Consortium (2007). "Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation." Br J Haematol **137**(3): 244-247.
- Hagstrom, S. A. and T. P. Dryja (1999). "Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2952-2957.
- Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff and J. E. Darnell, Jr. (1996). "The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase." EMBO J **15**(22): 6262-6268.
- Heissig, B., Y. Ohki, Y. Sato, S. Rafii, Z. Werb and K. Hattori (2005). "A role for niches in hematopoietic cell development." Hematology **10**(3): 247-253.
- Hinshelwood, S., A. J. Bench and A. R. Green (1997). "Pathogenesis of polycythaemia vera." Blood Rev **11**(4): 224-232.
- Horvath, C. M., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1995). "A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain." Genes Dev **9**(8): 984-994.
- Hussein, K., O. Bock and H. Kreipe (2007). "Histological and molecular classification of chronic myeloproliferative disorders in the age of JAK2: persistence of old questions despite new answers." Pathobiology **74**(2): 72-80.

- Hussein, K., O. Bock, K. Theophile, N. von Neuhoff, T. Buhr, J. Schlue, G. Busche and H. Kreipe (2009). "JAK2(V617F) allele burden discriminates essential thrombocythemia from a subset of prefibrotic-stage primary myelofibrosis." Exp Hematol **37**(10): 1186-1193 e1187.
- Hussein, K., K. Brakensiek, M. Ballmaier, M. Bormann, G. Gohring, T. Buhr, O. Bock and H. Kreipe (2006). "B-CLL developing in a patient with PV is not affected by V617F mutation of the Janus kinase 2." Eur J Haematol **77**(6): 539-541.
- Hussein, K., K. Brakensiek, G. Buesche, T. Buhr, B. Wiese, H. Kreipe and O. Bock (2007). "Different involvement of the megakaryocytic lineage by the JAK2 V617F mutation in Polycythemia vera, essential thrombocythemia and chronic idiopathic myelofibrosis." Ann Hematol **86**(4): 245-253.
- Hussein, K., G. Busche, J. Schlue, U. Lehmann and H. Kreipe (2012). "[Myeloproliferative neoplasms: histopathological and molecular pathological diagnosis]." Pathologe **33**(6): 508-517.
- Irie-Sasaki, J., T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K. Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein and J. M. Penninger (2001). "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling." Nature **409**(6818): 349-354.
- Ishii, T., E. Bruno, R. Hoffman and M. Xu (2006). "Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera." Blood **108**(9): 3128-3134.
- James, C., V. Ugo, J. P. Le Couedic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garcon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J. L. Villeval, S. N. Constantinescu, N. Casadevall and W. Vainchenker (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." Nature **434**(7037): 1144-1148.
- Jamieson, C. H., J. Gotlib, J. A. Durocher, M. P. Chao, M. R. Mariappan, M. Lay, C. Jones, J. L. Zehnder, S. L. Lilleberg and I. L. Weissman (2006). "The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6224-6229.
- Jones, A. V., A. Chase, R. T. Silver, D. Oscier, K. Zoi, Y. L. Wang, H. Cario, H. L. Pahl, A. Collins, A. Reiter, F. Grand and N. C. Cross (2009). "JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms." Nat Genet **41**(4): 446-449.
- Jones, A. V., S. Kreil, K. Zoi, K. Waghorn, C. Curtis, L. Zhang, J. Score, R. Sear, A. J. Chase, F. H. Grand, H. White, C. Zoi, D. Loukopoulos, E. Terpos, E. C. Vervessou, B. Schultheis, M. Emig, T. Ernst, E. Lengfelder, R. Hehlmann, A. Hochhaus, D. Oscier, R. T. Silver, A. Reiter and N. C. Cross (2005). "Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders." Blood **106**(6): 2162-2168.
- Karow/Lange-Roth (2011). Pharmakologie und Toxikologie. Cologne, Selbstverlag.

Kiladjian, J. J., F. Cervantes, F. W. Leebeek, C. Marzac, B. Cassinat, S. Chevret, D. Cazals-Hatem, A. Plessier, J. C. Garcia-Pagan, S. Darwish Murad, S. Raffa, H. L. Janssen, C. Gardin, S. Cereja, C. Tonetti, S. Giraudier, B. Condat, N. Casadevall, P. Fenaux and D. C. Valla (2008). "The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases." *Blood* **111**(10): 4922-4929.

Kiladjian, J. J., S. Chevret, C. Dosquet, C. Chomienne and J. D. Rain (2011). "Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980." *J Clin Oncol* **29**(29): 3907-3913.

Kilpivaara, O., S. Mukherjee, A. M. Schram, M. Wadleigh, A. Mullally, B. L. Ebert, A. Bass, S. Marubayashi, A. Heguy, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, K. Offit, R. M. Stone, D. G. Gilliland, R. J. Klein and R. L. Levine (2009). "A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms." *Nat Genet* **41**(4): 455-459.

Klampfl, T., H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan, H. Nivarthi, E. Rumi, J. D. Milosevic, N. C. Them, T. Berg, B. Gisslinger, D. Pietra, D. Chen, G. I. Vladimer, K. Bagienski, C. Milanese, I. C. Casetti, E. Sant'Antonio, V. Ferretti, C. Elena, F. Schischlik, C. Cleary, M. Six, M. Schalling, A. Schonegger, C. Bock, L. Malcovati, C. Pascutto, G. Superti-Furga, M. Cazzola and R. Kralovics (2013). "Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms." *N Engl J Med* **369**(25): 2379-2390.

Knudson, A. G. (1996). "Hereditary cancer: two hits revisited." *J Cancer Res Clin Oncol* **122**(3): 135-140.

Ko, M., Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski and A. Rao (2010). "Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2." *Nature* **468**(7325): 839-843.

Kobayashi, S., M. Teramura, S. Hoshino, T. Motoji, K. Oshimi and H. Mizoguchi (1993). "Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3." *Br J Haematol* **83**(4): 539-544.

Komura, E., H. Chagraoui, V. Mansat de Mas, B. Blanchet, P. de Sepulveda, F. Larbret, J. Larghero, M. Tulliez, N. Debili, W. Vainchenker and S. Giraudier (2003). "Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression." *Exp Hematol* **31**(7): 622-630.

Kondo, T., N. Okuno, H. Naruse, M. Kishimoto, T. Tasaka, T. Tsujioka, A. Matsuoka, T. Sugihara, Y. Tohyama and K. Tohyama (2008). "Validation of the revised 2008 WHO diagnostic criteria in 75 suspected cases of myeloproliferative neoplasm." *Leuk Lymphoma* **49**(9): 1784-1791.

Koren-Michowitz, M., J. Landman, Y. Cohen, N. Rahimi-Levene, O. Salomon, M. Michael, N. Amariglio and A. Nagler (2012). "JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis." *Leuk Lymphoma* **53**(11): 2210-2213.

- Kralovics, R., F. Passamonti, A. S. Buser, S. S. Teo, R. Tiedt, J. R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola and R. C. Skoda (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." N Engl J Med **352**(17): 1779-1790.
- Kralovics, R., S. S. Teo, A. S. Buser, M. Brutsche, R. Tiedt, A. Tichelli, F. Passamonti, D. Pietra, M. Cazzola and R. C. Skoda (2005). "Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2." Blood **106**(10): 3374-3376.
- Krebs, D. L. and D. J. Hilton (2001). "SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling." Stem Cells **19**(5): 378-387.
- Lacout, C., D. F. Pisani, M. Tulliez, F. M. Gachelin, W. Vainchenker and J. L. Villeval (2006). "JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis." Blood **108**(5): 1652-1660.
- Landgren, O., L. R. Goldin, S. Y. Kristinsson, E. A. Helgadottir, J. Samuelsson and M. Bjorkholm (2008). "Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24,577 first-degree relatives of 11,039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden." Blood **112**(6): 2199-2204.
- Landolfi, R., G. Ciabattini, P. Patrignani, M. A. Castellana, E. Pogliani, B. Bizzi and C. Patrono (1992). "Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo." Blood **80**(8): 1965-1971.
- Landolfi, R., R. Marchioli, J. Kutti, H. Gisslinger, G. Tognoni, C. Patrono, T. Barbui and I. European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (2004). "Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera." N Engl J Med **350**(2): 114-124.
- Langemeijer, S. M., R. P. Kuiper, M. Berends, R. Knops, M. G. Aslanyan, M. Massop, E. Stevens-Linders, P. van Hoogen, A. G. van Kessel, R. A. Raymakers, E. J. Kamping, G. E. Verhoef, E. Verburch, A. Hagemeyer, P. Vandenberghe, T. de Witte, B. A. van der Reijden and J. H. Jansen (2009). "Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes." Nat Genet **41**(7): 838-842.
- Larsen, T. S., J. H. Christensen, H. C. Hasselbalch and N. Pallisgaard (2007). "The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders." Br J Haematol **136**(5): 745-751.
- Lasho, T. L., R. Mesa, D. G. Gilliland and A. Tefferi (2005). "Mutation studies in CD3+, CD19+ and CD34+ cell fractions in myeloproliferative disorders with homozygous JAK2(V617F) in granulocytes." Br J Haematol **130**(5): 797-799.
- Lasho, T. L., A. Pardanani and A. Tefferi (2010). "LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis." N Engl J Med **363**(12): 1189-1190.
- Lataillade, J. J., O. Pierre-Louis, H. C. Hasselbalch, G. Uzan, C. Jasmin, M. C. Martyre, M. C. Le Bousse-Kerdiles, I. French and E. N. o. M. the European (2008). "Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence." Blood **112**(8): 3026-3035.

- Le, D. T., N. Kong, Y. Zhu, J. O. Lauchle, A. Aiyigari, B. S. Braun, E. Wang, S. C. Kogan, M. M. Le Beau, L. Parada and K. M. Shannon (2004). "Somatic inactivation of Nf1 in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder." Blood **103**(11): 4243-4250.
- Leonard, W. J. (2001). "Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction." Int J Hematol **73**(3): 271-277.
- Levine, R. L. (2012). "JAK-mutant myeloproliferative neoplasms." Curr Top Microbiol Immunol **355**: 119-133.
- Levine, R. L., M. Loriaux, B. J. Huntly, M. L. Loh, M. Beran, E. Stoffregen, R. Berger, J. J. Clark, S. G. Willis, K. T. Nguyen, N. J. Flores, E. Estey, N. Gattermann, S. Armstrong, A. T. Look, J. D. Griffin, O. A. Bernard, M. C. Heinrich, D. G. Gilliland, B. Druker and M. W. Deininger (2005). "The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia." Blood **106**(10): 3377-3379.
- Levine, R. L., A. Pardanani, A. Tefferi and D. G. Gilliland (2007). "Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders." Nat Rev Cancer **7**(9): 673-683.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, J. Cools, B. L. Ebert, G. Wernig, B. J. Huntly, T. J. Boggon, I. Wlodarska, J. J. Clark, S. Moore, J. Adelsperger, S. Koo, J. C. Lee, S. Gabriel, T. Mercher, A. D'Andrea, S. Frohling, K. Dohner, P. Marynen, P. Vandenberghe, R. A. Mesa, A. Tefferi, J. D. Griffin, M. J. Eck, W. R. Sellers, M. Meyerson, T. R. Golub, S. J. Lee and D. G. Gilliland (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." Cancer Cell **7**(4): 387-397.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-662.
- Ley, T. J., L. Ding, M. J. Walter, M. D. McLellan, T. Lamprecht, D. E. Larson, C. Kandoth, J. E. Payton, J. Baty, J. Welch, C. C. Harris, C. F. Lichti, R. R. Townsend, R. S. Fulton, D. J. Dooling, D. C. Koboldt, H. Schmidt, Q. Zhang, J. R. Osborne, L. Lin, M. O'Laughlin, J. F. McMichael, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, V. J. Magrini, T. L. Vickery, J. Hundal, L. L. Cook, J. J. Conyers, G. W. Swift, J. P. Reed, P. A. Alldredge, T. Wylie, J. Walker, J. Kalicki, M. A. Watson, S. Heath, W. D. Shannon, N. Varghese, R. Nagarajan, P. Westervelt, M. H. Tomasson, D. C. Link, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, E. R. Mardis and R. K. Wilson (2010). "DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia." N Engl J Med **363**(25): 2424-2433.
- Li, Y., G. Hetet, A. M. Maurer, Y. Chait, D. Dhermy and J. Briere (1994). "Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF." Br J Haematol **87**(3): 471-476.
- Liu, E., J. Jelinek, Y. D. Pastore, Y. Guan, J. F. Prchal and J. T. Prchal (2003). "Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin." Blood **101**(8): 3294-3301.

Luo, H., P. Rose, D. Barber, W. P. Hanratty, S. Lee, T. M. Roberts, A. D. D'Andrea and C. R. Dearolf (1997). "Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1562-1571.

M. Dietl, N. S., M. Zeitz (2008). *Harrisons Innere Medizin*.

Marchioli, R., G. Finazzi, G. Specchia, R. Cacciola, R. Cavazzina, D. Cilloni, V. De Stefano, E. Elli, A. Iurlo, R. Latagliata, F. Lunghi, M. Lunghi, R. M. Marfisi, P. Musto, A. Masciulli, C. Musolino, N. Cascavilla, G. Quarta, M. L. Randi, D. Rapezzi, M. Ruggeri, E. Rumi, A. R. Scortechini, S. Santini, M. Scarano, S. Siragusa, A. Spadea, A. Tieghi, E. Angelucci, G. Visani, A. M. Vannucchi, T. Barbui and C.-P. C. Group (2013). "Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera." *N Engl J Med* **368**(1): 22-33.

Marcucci, G., K. Maharry, Y. Z. Wu, M. D. Radmacher, K. Mrozek, D. Margeson, K. B. Holland, S. P. Whitman, H. Becker, S. Schwind, K. H. Metzeler, B. L. Powell, T. H. Carter, J. E. Kolitz, M. Wetzler, A. J. Carroll, M. R. Baer, M. A. Caligiuri, R. A. Larson and C. D. Bloomfield (2010). "IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study." *J Clin Oncol* **28**(14): 2348-2355.

Mardis, E. R., L. Ding, D. J. Dooling, D. E. Larson, M. D. McLellan, K. Chen, D. C. Koboldt, R. S. Fulton, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, D. P. Locke, V. J. Magrini, R. M. Abbott, T. L. Vickery, J. S. Reed, J. S. Robinson, T. Wylie, S. M. Smith, L. Carmichael, J. M. Eldred, C. C. Harris, J. Walker, J. B. Peck, F. Du, A. F. Dukes, G. E. Sanderson, A. M. Brummett, E. Clark, J. F. McMichael, R. J. Meyer, J. K. Schindler, C. S. Pohl, J. W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M. E. Wiechert, J. V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. A. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, R. K. Wilson and T. J. Ley (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome." *N Engl J Med* **361**(11): 1058-1066.

Moliterno, A. R., D. M. Williams, O. Rogers, M. A. Isaacs and J. L. Spivak (2008). "Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens." *Exp Hematol* **36**(11): 1480-1486.

Moran-Crusio, K., L. Reavie, A. Shih, O. Abdel-Wahab, D. Ndiaye-Lobry, C. Lobry, M. E. Figueroa, A. Vasanthakumar, J. Patel, X. Zhao, F. Perna, S. Pandey, J. Madzo, C. Song, Q. Dai, C. He, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, S. D. Nimer, A. Melnick, L. A. Godley, I. Aifantis and R. L. Levine (2011). "Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation." *Cancer Cell* **20**(1): 11-24.

Morrison, S. J., N. Uchida and I. L. Weissman (1995). "The biology of hematopoietic stem cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 35-71.

Muller, P., D. Kuttenukeuler, V. Gesellchen, M. P. Zeidler and M. Boutros (2005). "Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference." *Nature* **436**(7052): 871-875.

Muth, M., B. M. Engelhardt, N. Kroger, K. Hussein, J. Schlue, G. Busche, H. H. Kreipe and O. Bock (2011). "Thrombospondin-1 (TSP-1) in primary myelofibrosis (PMF) - a megakaryocyte-derived biomarker which largely discriminates PMF from essential thrombocythemia." Ann Hematol **90**(1): 33-40.

Myers, M. P., J. N. Andersen, A. Cheng, M. L. Tremblay, C. M. Horvath, J. P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford and N. K. Tonks (2001). "TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B." J Biol Chem **276**(51): 47771-47774.

Nangalia, J., C. E. Massie, E. J. Baxter, F. L. Nice, G. Gundem, D. C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D. G. Kent, A. Aziz, A. L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A. V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H. P. Harding, J. D. Fitzpatrick, C. T. Goudie, C. A. Ortmann, S. J. Loughran, K. Raine, D. R. Jones, A. P. Butler, J. W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M. Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B. J. Huntly, C. N. Harrison, N. C. Cross, D. Ron, A. M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P. J. Campbell and A. R. Green (2013). "Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2." N Engl J Med **369**(25): 2391-2405.

Nauck, M., H. Gierens, W. Marz and H. Wieland (2001). "Rapid detection of a common dihydropyrimidine dehydrogenase mutation associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria using fluorogenic hybridization probes." Clin Biochem **34**(2): 103-105.

Nelms, K., T. J. O'Neill, S. Li, S. R. Hubbard, T. A. Gustafson and W. E. Paul (1999). "Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain." Mamm Genome **10**(12): 1160-1167.

Nikoloski, G., S. M. Langemeijer, R. P. Kuiper, R. Knops, M. Massop, E. R. Tonnissen, A. van der Heijden, T. N. Scheele, P. Vandenberghe, T. de Witte, B. A. van der Reijden and J. H. Jansen (2010). "Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes." Nat Genet **42**(8): 665-667.

Oh, S. T. and J. Gotlib (2010). "JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms." Expert Rev Hematol **3**(3): 323-337.

Ohyashiki, K., Y. Aota, D. Akahane, A. Gotoh and J. H. Ohyashiki (2007). "JAK2(V617F) mutational status as determined by semiquantitative sequence-specific primer-single molecule fluorescence detection assay is linked to clinical features in chronic myeloproliferative disorders." Leukemia **21**(5): 1097-1099.

Olcaydu, D., A. Harutyunyan, R. Jager, T. Berg, B. Gisslinger, I. Pabinger, H. Gisslinger and R. Kralovics (2009). "A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms." Nat Genet **41**(4): 450-454.

Pal, N., R. B. Wadey, B. Buckle, E. Yeomans, J. Pritchard and J. K. Cowell (1990). "Preferential loss of maternal alleles in sporadic Wilms' tumour." Oncogene **5**(11): 1665-1668.

- Pardanani, A., T. L. Lasho, C. Finke, R. A. Mesa, W. J. Hogan, R. P. Ketterling, D. G. Gilliland and A. Tefferi (2007). "Extending Jak2V617F and MplW515 mutation analysis to single hematopoietic colonies and B and T lymphocytes." *Stem Cells* **25**(9): 2358-2362.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, C. M. Finke, M. Mai, R. F. McClure and A. Tefferi (2010). "IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms." *Leukemia* **24**(6): 1146-1151.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, C. M. Finke and A. Tefferi (2011). "Infrequent occurrence of MPL exon 10 mutations in polycythemia vera and post-polycythemia vera myelofibrosis." *Am J Hematol* **86**(8): 701-702.
- Pardanani, A. D., R. L. Levine, T. Lasho, Y. Pikman, R. A. Mesa, M. Wadleigh, D. P. Steensma, M. A. Elliott, A. P. Wolanskyj, W. J. Hogan, R. F. McClure, M. R. Litzow, D. G. Gilliland and A. Tefferi (2006). "MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients." *Blood* **108**(10): 3472-3476.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, L. E. Ailles and I. L. Weissman (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**: 11842-11849.
- Pikman, Y., B. H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B. L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D. J. DeAngelo, J. J. Clark, S. J. Lee, T. R. Golub, M. Wadleigh, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2006). "MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia." *PLoS Med* **3**(7): e270.
- Quivoron, C., L. Couronne, V. Della Valle, C. K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M. H. Stern, L. Godley, P. Opolon, H. Tilly, E. Solary, Y. Duffourd, P. Dessen, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, W. Vainchenker, C. Bastard, T. Mercher and O. A. Bernard (2011). "TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis." *Cancer Cell* **20**(1): 25-38.
- Raghavan, M., D. M. Lillington, S. Skoulakis, S. Debernardi, T. Chaplin, N. J. Foot, T. A. Lister and B. D. Young (2005). "Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias." *Cancer Res* **65**(2): 375-378.
- Rotunno, G., C. Mannarelli, P. Guglielmelli, A. Pacilli, A. Pancrazzi, L. Pieri, T. Fanelli, A. Bosi, A. M. Vannucchi and I. Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative (2014). "Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia." *Blood* **123**(10): 1552-1555.
- Rumi, E., D. Pietra, V. Ferretti, T. Klampfl, A. S. Harutyunyan, J. D. Milosevic, N. C. Them, T. Berg, C. Elena, I. C. Casetti, C. Milanesi, E. Sant'antonio, M. Bellini, E. Fugazza, M. C. Renna, E. Boveri, C. Astori, C. Pascutto, R. Kralovics and M. Cazzola (2013). "JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes." *Blood*.

Schindler, U., P. Wu, M. Rothe, M. Brasseur and S. L. McKnight (1995). "Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity." *Immunity* **2**(6): 689-697.

Scott, L. M., M. A. Scott, P. J. Campbell and A. R. Green (2006). "Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia." *Blood* **108**(7): 2435-2437.

Scott, L. M., W. Tong, R. L. Levine, M. A. Scott, P. A. Beer, M. R. Stratton, P. A. Futreal, W. N. Erber, M. F. McMullin, C. N. Harrison, A. J. Warren, D. G. Gilliland, H. F. Lodish and A. R. Green (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis." *N Engl J Med* **356**(5): 459-468.

Shide, K., H. K. Shimoda, T. Kumano, K. Karube, T. Kameda, K. Takenaka, S. Oku, H. Abe, K. S. Katayose, Y. Kubuki, K. Kusumoto, S. Hasuike, Y. Tahara, K. Nagata, T. Matsuda, K. Ohshima, M. Harada and K. Shimoda (2008). "Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F." *Leukemia* **22**(1): 87-95.

Shuai, K. (2000). "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins." *Oncogene* **19**(21): 2638-2644.

Skoda, R. C. (2010). "Hereditary myeloproliferative disorders." *Haematologica* **95**(1): 6-8.

Spangrude, G. J., S. Heimfeld and I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." *Science* **241**(4861): 58-62.

Stegelmann, F., L. Bullinger, R. F. Schlenk, P. Paschka, M. Griesshammer, C. Blersch, S. Kuhn, S. Schauer, H. Dohner and K. Dohner (2011). "DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms." *Leukemia* **25**(7): 1217-1219.

Suda, T., F. Arai and A. Hirao (2005). "Hematopoietic stem cells and their niche." *Trends Immunol* **26**(8): 426-433.

Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." *Science* **324**(5929): 930-935.

Tan, P. T. and A. H. Wei (2011). "The epigenomics revolution in myelodysplasia: a clinico-pathological perspective." *Pathology* **43**(6): 536-546.

Tefferi, A. (2000). "Myelofibrosis with myeloid metaplasia." *N Engl J Med* **342**(17): 1255-1265.

Tefferi, A. (2005). "Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia." *J Clin Oncol* **23**(33): 8520-8530.

Tefferi, A. (2008). "Mutant molecules of interest in myeloproliferative neoplasms: introduction." *Acta Haematol* **119**(4): 192-193.

Tefferi, A. and T. Barbui (2015). "Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management." Am J Hematol **90**(2): 162-173.

Tefferi, A., P. Guglielmelli, D. R. Larson, C. Finke, E. A. Wassie, L. Pieri, N. Gangat, R. Fjerza, A. A. Belachew, T. L. Lasho, R. P. Ketterling, C. A. Hanson, A. Rambaldi, G. Finazzi, J. Thiele, T. Barbui, A. Pardanani and A. M. Vannucchi (2014). "Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis." Blood **124**(16): 2507-2513; quiz 2615.

Tefferi, A., T. L. Lasho, C. M. Finke, R. A. Knudson, R. Ketterling, C. H. Hanson, M. Maffioli, D. Caramazza, F. Passamonti and A. Pardanani (2014). "CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons." Leukemia **28**(7): 1472-1477.

Tefferi, A., T. L. Lasho, S. M. Schwager, J. S. Strand, M. Elliott, R. Mesa, C. Y. Li, M. Wadleigh, S. J. Lee and D. G. Gilliland (2006). "The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera." Cancer **106**(3): 631-635.

Tefferi, A., A. Pardanani, K. H. Lim, O. Abdel-Wahab, T. L. Lasho, J. Patel, N. Gangat, C. M. Finke, S. Schwager, A. Mullally, C. Y. Li, C. A. Hanson, R. Mesa, O. Bernard, F. Delhommeau, W. Vainchenker, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2009). "TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis." Leukemia **23**(5): 905-911.

Tefferi, A., J. J. Strand, T. L. Lasho, R. A. Knudson, C. M. Finke, N. Gangat, A. Pardanani, C. A. Hanson and R. P. Ketterling (2007). "Bone marrow JAK2V617F allele burden and clinical correlates in polycythemia vera." Leukemia **21**(9): 2074-2075.

Tefferi, A., J. Thiele, A. M. Vannucchi and T. Barbui (2014). "An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms." Leukemia.

Tefferi, A. and W. Vainchenker (2011). "Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies." J Clin Oncol **29**(5): 573-582.

Tefferi, A. and J. W. Vardiman (2008). "Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms." Leukemia **22**(1): 14-22.

Thiele, J., H. M. Kvasnicka, L. Mullauer, V. Buxhofer-Ausch, B. Gisslinger and H. Gisslinger (2011). "Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification." Blood **117**(21): 5710-5718.

Toyama, K., M. Karasawa, A. Yokohama, T. Mitsui, H. Uchiumi, T. Saitoh, H. Handa, H. Murakami, Y. Nojima and N. Tsukamoto (2011). "Differences in the JAK2 and MPL mutation status in the cell lineages of the bcr/abl-negative chronic myeloproliferative neoplasm subtypes." Intern Med **50**(21): 2557-2561.

Ugo, V., C. Marzac, I. Teyssandier, F. Larbret, Y. Lecluse, N. Debili, W. Vainchenker and N. Casadevall (2004). "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera." Exp Hematol **32**(2): 179-187.

Vannucchi, A. M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, G. Longo, A. Pancrazzi, V. Ponziani, C. Bogani, P. R. Ferrini, A. Rambaldi, V. Guerini, A. Bosi, T. Barbui and M. P. D. R. Consortium (2007). "Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden." Leukemia **21**(9): 1952-1959.

Vannucchi, A. M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, A. Pancrazzi, V. Guerini, G. Barosi, M. Ruggeri, G. Specchia, F. Lo-Coco, F. Delaini, L. Villani, S. Finotto, E. Ammatuna, R. Alterini, V. Carrai, G. Capaccioli, S. Di Lollo, V. Liso, A. Rambaldi, A. Bosi and T. Barbui (2008). "Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia." Blood **112**(3): 844-847.

Vannucchi, A. M., E. Antonioli, P. Guglielmelli, A. Rambaldi, G. Barosi, R. Marchioli, R. M. Marfisi, G. Finazzi, V. Guerini, F. Fabris, M. L. Randi, V. De Stefano, S. Caberlon, A. Tafuri, M. Ruggeri, G. Specchia, V. Liso, E. Rossi, E. Pogliani, L. Gugliotta, A. Bosi and T. Barbui (2007). "Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia." Blood **110**(3): 840-846.

Wadey, R. B., N. Pal, B. Buckle, E. Yeomans, J. Pritchard and J. K. Cowell (1990). "Loss of heterozygosity in Wilms' tumour involves two distinct regions of chromosome 11." Oncogene **5**(6): 901-907.

Walkley, C. R., G. H. Olsen, S. Dworkin, S. A. Fabb, J. Swann, G. A. McArthur, S. V. Westmoreland, P. Chambon, D. T. Scadden and L. E. Purton (2007). "A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency." Cell **129**(6): 1097-1110.

Walkley, C. R., J. M. Shea, N. A. Sims, L. E. Purton and S. H. Orkin (2007). "Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment." Cell **129**(6): 1081-1095.

Ward, P. S., J. Patel, D. R. Wise, O. Abdel-Wahab, B. D. Bennett, H. A. Collier, J. R. Cross, V. R. Fantin, C. V. Hedvat, A. E. Perl, J. D. Rabinowitz, M. Carroll, S. M. Su, K. A. Sharp, R. L. Levine and C. B. Thompson (2010). "The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate." Cancer Cell **17**(3): 225-234.

Wernig, G., T. Mercher, R. Okabe, R. L. Levine, B. H. Lee and D. G. Gilliland (2006). "Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model." Blood **107**(11): 4274-4281.

Wolanskyj, A. P., T. L. Lasho, S. M. Schwager, R. F. McClure, M. Wadleigh, S. J. Lee, D. G. Gilliland and A. Tefferi (2005). "JAK2 mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance." Br J Haematol **131**(2): 208-213.

Yan, X. J., J. Xu, Z. H. Gu, C. M. Pan, G. Lu, Y. Shen, J. Y. Shi, Y. M. Zhu, L. Tang, X. W. Zhang, W. X. Liang, J. Q. Mi, H. D. Song, K. Q. Li, Z. Chen and S. J. Chen (2011). "Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia." Nat Genet **43**(4): 309-315.

Zhao, R., S. Xing, Z. Li, X. Fu, Q. Li, S. B. Krantz and Z. J. Zhao (2005). "Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera." J Biol Chem **280**(24): 22788-22792.

## 8 Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotionsarbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Karl Sotlar danke ich für die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit meine Dissertation am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München zu absolvieren. Bei Fragen und Problemen stand er mir jederzeit zur Verfügung.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut durchführen zu können.

Darüberhinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Horny für die Unterstützung bei der Beurteilung der Knochenmarkshistologie und zahlreichen fachlichen Diskussionen. Ich bin überzeugt, dass ihm Wenige auf dem Gebiet der Hämatopathologie das Wasser reichen können.

Ein weiterer Dank auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung sowie an die gesamte AG Jung, die mir sowohl beim Erlernen des Pyrosequencing als auch bei jeglichen technischen und theoretischen Fragen zur Seite standen.

Bei Andrea Sendelhofert und Anja Heier möchte ich mich für die Unterstützung beim Erlernen der immunhistochemischen Färbungen sowie bei der Entwicklung neuer immunhistochemischer Doppelmarkierungen bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an meine Kollegen Dr. rer. nat. Karina Petat-Dutter, Daniel Hofmann, Dr. med. Harald Bartsch und Dr. med. vet. Larissa Butschek für die enge, kollegiale Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung im Laboralltag.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Einwächter für die Hilfe bei meinen kleinen alltäglichen „Computer-Schwierigkeiten“ beim Erstellen dieser Dissertation bedanken.

Tausend Dank auch an Annette Weiser, Carolin Bestendonk und Dr. med. David Jochheim für die fachlichen und grammatikalischen Ratschläge und natürlich auch dafür, dass ihr ein Teil meines Lebens seit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter bedanken, die mir das Studium der Medizin ermöglichten und mir während meiner Promotion immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Hämatopoese .....	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der JAK-STAT Signalkaskade .....	8
Abbildung 3:	Mechanismus der <i>JAK2</i> Aktivierung durch die <i>JAK2</i> Mutationen .....	11
Abbildung 4:	<i>Real Detektion System</i> APAAP.....	31
Abbildung 5:	<i>Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode</i> .....	32
Abbildung 6:	Ablauf der PCR für die späteren Analysen mittels Lightcycler .....	35
Abbildung 7:	Ablauf der Schmelzpunktanalyse am Light-Cycler®.....	37
Abbildung 8:	Darstellung der Schmelzpunktanalyse eines <i>JAK2</i> V617F positiven und <i>JAK2wt</i> Patienten .....	37
Abbildung 9:	Prinzipien der Pyrosequenzierung .....	39
Abbildung 10:	Darstellung der Pyrosequenzierungen eines <i>JAK2</i> V617F positiven und <i>JAK2 wt</i> Patienten.....	42
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des Palm <i>Micro-Beam-Systems</i> .....	43
Abbildung 12:	Mikrodissektion von hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark ....	44-45
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der charakteristischen Histologie der ET und frühen Phase einer PMF .....	52
Abbildung 14:	Histologie der PV, PMF und ET.....	53
Abbildung 15:	Verdünnungsreihen .....	55
Abbildung 16:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an Gesamt DNA.....	56
Abbildung 17:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten Erythroblasten .....	58
Abbildung 18:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten Megakaryozyten ....	60
Abbildung 19:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten neutrophilen Granulozyten .....	61
Abbildung 20:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten eosinophilen Granulozyten .....	62
Abbildung 21:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten basophile Granulozyten .....	64
Abbildung 22:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten Mastzellen .....	65
Abbildung 23:	<i>JAK2</i> V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten T-Lymphozyten .....	67
Abbildung 24:	Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer a.e. homozygoten <i>JAK2</i> V617F Mutation des Patienten PV2 .....	69
Abbildung 25:	Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer heterozygoten <i>JAK2</i> V617F Mutation des Patienten PMF4 .....	70
Abbildung 26:	Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf einer heterozygoten <i>JAK2</i> V617F Mutation des Patienten ET1.....	71

## 10 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1:	Vorkommen der <i>JAK2</i> V617F, <i>JAK2</i> Exon 12, <i>MPL</i> - und <i>CALR</i> -Mutationen bei der PV, ET und PMF .....	<b>15</b>
Tabelle 2:	WHO-Kriterien PV .....	<b>18</b>
Tabelle 3:	Modifizierte WHO-Kriterien der Essentielle Thrombozythämie .....	<b>20</b>
Tabelle 4:	IPSS Prognose Score .....	<b>21</b>
Tabelle 5:	WHO-Kriterien der PMF .....	<b>22</b>
Tabelle 6:	WHO Kriterien der Post-ET/PV-MF .....	<b>23</b>
Tabelle 7:	WHO-Kriterien für die Knochenmarksfibrose .....	<b>24</b>
Tabelle 8:	Übersicht der verwendeten Antikörper .....	<b>29</b>
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten Detektionssysteme, Chromogene und Antikörper .....	<b>30</b>
Tabelle 10:	Übersicht der verwendeten Primer .....	<b>34</b>
Tabelle 11:	Übersicht der verwendeten Hybridisierungssonden <i>JAK2</i> V617F .....	<b>36</b>
Tabelle 12:	Mikrodissektionsschema der Verdünnungsreihe .....	<b>47</b>
Tabelle 13:	Übersicht der verwendeten Hybridisierungssonden <i>MPL</i> W515L .....	<b>49</b>
Tabelle 14:	Übersicht der verwendeten Primer <i>CALR</i> .....	<b>50</b>
Tabelle 15:	Detaillierte Patientendaten, Laborparameter und Molekularbefunde .....	<b>54</b>
Tabelle 16:	Übersicht aller Ergebnisse .....	<b>68</b>

## 11 Eidesstattliche Versicherung

Fahrenkrog-Petersen, Leonie Sarah

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „*JAK2* V617F Mutationsanalysen an mikrodisektierten Zellen bei myeloproliferativen Neoplasien“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 29.01.2018

L. Fahrenkrog-Petersen